

(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2004-77387

(P2004-77387A)

(43) 公開日 平成16年3月11日(2004.3.11)

(51) Int. Cl.⁷

GO 1 N 33/543
GO 1 N 33/53
GO 1 N 37/00

F I

GO 1 N 33/543 5 2 1
GO 1 N 33/543 5 9 5
GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 37/00 1 0 1

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2002-240815 (P2002-240815)	(71) 出願人	000006208 三菱重工業株式会社 東京都港区港南二丁目16番5号
(22) 出願日	平成14年8月21日 (2002.8.21)	(74) 代理人	100058479 弁理士 鈴江 武彦
		(74) 代理人	100084618 弁理士 村松 貞男
		(74) 代理人	100068814 弁理士 坪井 淳
		(74) 代理人	100092196 弁理士 橋本 良郎
		(74) 代理人	100091351 弁理士 河野 哲
		(74) 代理人	100100952 弁理士 風間 鉄也

最終頁に続く

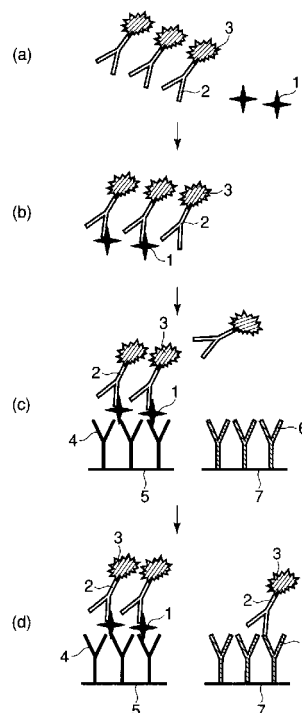
(54) 【発明の名称】 タンパク質検出方法及びタンパク質検出装置

(57) 【要約】

【課題】 臨床医療現場において簡便に使用することができ、短時間で高感度に対象タンパク質を検出することができるタンパク質検出方法及びタンパク質検出装置を提供する。

【解決手段】 検出対象のタンパク質と特異的に反応し、かつ標識物質が担持された所定量の標識抗体を準備し、前記タンパク質を含む可能性がある検体試料液と前記標識抗体とを混合する工程と、前記混合液を微小流路に送給し、前記微小流路内に固定化された第一の感知抗体に前記混合液を流動接触させる工程と、引き続き、前記微小流路内に固定化された第二の感知抗体に前記混合液を流動接触させる工程と、前記混合液を前記微小流路内から排出する工程と、前記標識抗体が前記タンパク質を介して前記第一の感知抗体と結合して複合化した複合体と前記標識抗体が前記第二の感知抗体と直接結合して複合化した複合体とに検出光を照射して該複合体中に含まれる標識物質を検出する工程とを具備する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検出対象のタンパク質と特異的に反応し、かつ標識物質が担持された所定量の標識抗体を準備し、前記タンパク質を含む可能性がある検体試料液と前記標識抗体とを混合する工程と、

少なくとも一部に透光性の周壁を持つ微小流路を準備し、前記混合液を前記微小流路に送給し、前記微小流路内に固定化された第一の感知抗体に前記混合液を流動接触させることにより、前記混合液中のタンパク質と前記第一の感知抗体とを特異的に反応させる工程と、

引き続き、前記第一の感知抗体よりも下流側の前記微小流路内に固定化された第二の感知抗体に前記混合液を流動接触させることにより、前記混合液中の標識抗体と第二の感知抗体とを特異的に反応させる工程と、

前記第二の感知抗体に流動接触させた後に前記混合液を前記微小流路内から排出する工程と、

前記標識抗体が前記タンパク質を介して前記第一の感知抗体と結合して複合化した複合体に検出光を照射して該複合体中に含まれる標識物質を検出するとともに、前記標識抗体が前記第二の感知抗体と直接結合して複合化した複合体に検出光を照射して該複合体中に含まれる標識物質を検出する工程と、

を具備することを特徴とするタンパク質検出方法。

【請求項 2】

前記タンパク質が、心筋細胞が破壊されて血液中に溶出したヒトミオグロビンであることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記標識抗体、前記第一の感知抗体、前記第二の感知抗体が、それぞれ抗ヒトミオグロビン哺乳類 X 抗体、抗ヒトミオグロビン哺乳類 Y 抗体、抗哺乳類 X I g G 哺乳類 Z 抗体であることを特徴とする請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記哺乳類 X はウサギであり、前記哺乳類 Y はマウスであり、前記哺乳類 Z はウサギ以外であることを特徴とする請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記標識物質が、金属コロイド、蛍光色素及び化学発光酵素からなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 ないし 4 のうちのいずれか 1 記載の方法。

【請求項 6】

検出対象のタンパク質と特異的に反応し、かつ標識物質が担持された標識抗体と検体試料液とを混合させる混合手段と、

前記混合液が導入される微小流路と、

前記微小流路内に前記混合液を送給する送液手段と、

前記タンパク質と特異的に反応する第一の感知抗体が前記微小流路を取り囲む周壁に固定化された第一の反応部と、

前記第一の反応部よりも下流側に設けられ、前記標識抗体と特異的に反応する第二の感知抗体が前記微小流路を取り囲む周壁に固定化された第二の反応部と、前記第二の反応部を通過した前記微小流路内の混合液を排出する排液手段と、前記第一の反応部において前記標識抗体が前記タンパク質を介して前記第一の感知抗体と結合して複合化した複合体に検出光を照射して該複合体中に含まれる標識物質を検出するとともに、前記第二の反応部において前記標識抗体が前記第二の感知抗体と直接結合して複合化した複合体に検出光を照射して該複合体中に含まれる標識物質を検出する検出手段と、

を具備することを特徴とするタンパク質検出装置。

【請求項 7】

前記混合手段は、

前記微小流路の上流側に連通する第一の導入流路と、

10

20

30

40

50

所定量の前記標識抗体を含有する試薬液を前記微小流路に導入するために、前記微小流路の上流側で前記第一の導入流路に合流する第二の導入流路と、を具備し、前記送液手段は、前記検体試料液を前記第一の導入流路内に送給する圧送ポンプと、前記試薬液を前記第二の導入流路内に送給する圧送ポンプと、を具備することを特徴とする請求項6記載の装置。

【請求項8】

前記混合手段は、粉末状の前記標識抗体が含浸された多孔質部材と、前記多孔質部材に検体試料液を添加する手段と、前記多孔質部材に展開液を添加する手段と、を具備することを特徴とする請求項6記載の装置。

10

【請求項9】

前記検出手段が、表面プラズモン共鳴質量分析装置であることを特徴とする請求項6ないし8のうちのいずれか1記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗原-抗体反応を利用したタンパク質検出方法及びタンパク質検出装置に関する。

20

【0002】

【従来の技術】

ヒトの疾病の病症及び進度に対する予測を可能にするタンパク質等の指標物質は、その構造が比較的複雑である。このため、タンパク質等が分析対象である場合、分析物質は主に抗原-抗体反応を利用した免疫分析法により測定される。このような検査は、一般に特別な機器を備えた臨床実験室等で通常行われてきた。しかし近年、免疫分析のひとつの範ちゅうとして病院や応急室等の臨床医療現場での検査および家庭での自家診断の必要性が生じてきている。

【0003】

このため、専門知識や複雑な過程が要求されない上、使用が簡便で遂行時間が短い免疫分析システムの開発が試みられて来ている。このような診断性能を有する免疫分析システムの一例として、細孔性メンブレンを抗体の固定化母体として使用する免疫クロマトグラフィーがある。免疫クロマトグラフィーは、例えば、特開2001-4613号公報や特開2001-337065号公報に記載されている。

30

【0004】

従来の免疫クロマトグラフィー分析装置を用いた測定法は、以下に説明するように行われる。被検査溶液である液体試料をメンブレンストリップの試料添加部に添加すると、液体試料は細孔を通じた毛細管現象によりメンブレンに浸透して標識物保持部の領域に達する。この標識物保持部の領域に保持された標識試薬は、液体試料の浸透により溶解されながら、反応層の領域に浸透する。この反応層の領域上には、特異的なタンパク質が固定化されており、標識物保持部の領域から溶け出した標識試薬との結合反応が行われる。このとき、液体試料中に分析対象タンパク質が存在すれば、反応層上に保持された抗体固定化部に何らかの呈色反応が現れる。この呈色反応により標識試薬と結合した分析対象タンパク質の有無が判定される。最終的に液体試料は吸水部に吸収され反応は終了する。

40

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

このような免疫クロマトグラフィーは、簡便に対象タンパク質の有無を判定することができる。しかしながら、大部分の臨床試験は、各試料内に含まれた対象タンパク質成分の濃度決定が絶対的に要求される。

【0006】

50

このような定量分析を遂行するため、既存の光学的シグナル変換手段を利用して分析結果から現れる発色シグナルの光学密度或いは吸光度への変換が行われて来た。ところがこのような定量分析は変換方法が煩わしく、測定の感度が高くないという欠点を有する。また、従来の方法では、試料内に対象タンパク質が含有されない場合と測定の感度が良好でない場合との差異を判断するのが困難であった。

【0007】

さらに、免疫クロマトグラフィーは液体試料の移送にメンブレンの毛細管現象を用いるため、液体試料がメンブレン上の各領域に浸透するまでに時間を要し、反応結果が迅速に得られないという欠点も有した。

【0008】

本発明は、上記課題を解決するためになされたものであり、臨床医療現場において簡便に使用することができ、短時間で高感度に対象タンパク質を検出することができるタンパク質検出方法及びタンパク質検出装置を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明のタンパク質検出方法は、検出対象のタンパク質と特異的に反応し、かつ標識物質が担持された所定量の標識抗体を準備し、前記タンパク質を含む可能性がある検体試料液と前記標識抗体とを混合する工程と、

少なくとも一部に透光性の周壁を持つ微小流路を準備し、前記混合液を前記微小流路に送給し、前記微小流路内に固定化された第一の感知抗体に前記混合液を流動接触させることにより、前記混合液中のタンパク質と前記第一の感知抗体とを特異的に反応させる工程と、

引き続き、前記第一の感知抗体よりも下流側の前記微小流路内に固定化された第二の感知抗体に前記混合液を流動接触させることにより、前記混合液中の標識抗体と第二の感知抗体とを特異的に反応させる工程と、

前記第二の感知抗体に流動接触させた後に前記混合液を前記微小流路内から排出する工程と、

前記標識抗体が前記タンパク質を介して前記第一の感知抗体と結合して複合化した複合体に検出光を照射して該複合体中に含まれる標識物質を検出するとともに、前記標識抗体が前記第二の感知抗体と直接結合して複合化した複合体に検出光を照射して該複合体中に含まれる標識物質を検出する工程と、

を具備する。

【0010】

本発明のタンパク質検出方法は、前記タンパク質が、心筋細胞が破壊されて血液中に溶出したヒトミオグロビンであることが好ましい。

【0011】

本発明のタンパク質検出方法は、前記標識抗体、前記第一の感知抗体、前記第二の感知抗体が、それぞれ抗ヒトミオグロビン哺乳類X抗体、抗ヒトミオグロビン哺乳類Y抗体、抗哺乳類XIgG哺乳類Z抗体であることが好ましい。

【0012】

本発明のタンパク質検出方法は、前記哺乳類Xはウサギであり、前記哺乳類Yはマウスであり、前記哺乳類Zはウサギ以外であることが好ましく、特に前記哺乳類Zはマウスであることがより好ましい。

【0013】

本発明のタンパク質検出方法は、前記標識物質が、金属コロイド、蛍光色素及び化学発光酵素からなる群より選択されることが好ましい。

【0014】

本発明のタンパク質検出装置は、検出対象のタンパク質と特異的に反応し、かつ標識物質が担持された標識抗体と検体試料液とを混合させる混合手段と、前記混合液が導入される微小流路と、

10

20

30

40

50

前記微小流路内に前記混合液を送給する送液手段と、
前記タンパク質と特異的に反応する第一の感知抗体が前記微小流路を取り囲む周壁に固定化された第一の反応部と、
前記第一の反応部よりも下流側に設けられ、前記標識抗体と特異的に反応する第二の感知抗体が前記微小流路を取り囲む周壁に固定化された第二の反応部と、前記第二の反応部を通過した前記微小流路内の混合液を排出する排液手段と、前記第一の反応部において前記標識抗体が前記タンパク質を介して前記第一の感知抗体と結合して複合化した複合体に検出光を照射して該複合体中に含まれる標識物質を検出するとともに、前記第二の反応部において前記標識抗体が前記第二の感知抗体と直接結合して複合化した複合体に検出光を照射して該複合体中に含まれる標識物質を検出する検出手段と、
を具備することを特徴とする。

10

【0015】

本発明のタンパク質検出装置は、前記混合手段は、
前記微小流路の上流側に連通する第一の導入流路と、
所定量の前記標識抗体を含有する試薬液を前記微小流路に導入するために、前記微小流路の上流側で前記第一の導入流路に合流する第二の導入流路と、を具備し、
前記送液手段は、
前記検体試料液を前記第一の導入流路内に送給する圧送ポンプと、
前記試薬液を前記第二の導入流路内に送給する圧送ポンプと、を具備することが好ましい。

20

【0016】

本発明の検出装置は、前記混合手段は、
粉末状の前記標識抗体が含浸された多孔質部材と、
前記多孔質部材に検体試料液を添加する手段と、
前記多孔質部材に展開液を添加する手段と、
を具備することが好ましい。

【0017】

本発明のタンパク質検出装置は、前記検出手段が、表面プラズモン共鳴質量分析装置であることが好ましい。

【0018】

以下、本発明をより詳しく説明する。

30

【0019】

本発明のタンパク質検出方法およびタンパク質検出装置は、特定の抗原 - 抗体反応を利用する。抗原 - 抗体反応は選択された抗体の特性上、特異性が高く、また、典型的には結合親和力が非常に強く、極めて低い濃度で存在する分析物質を検出できる感性を示す。

【0020】

本発明は、ペプチドおよびポリペプチドを含むいかなるタンパク質をも検出対象とすることができ、アルブミン、グロブリン、プロラミン、グルテリン、ヒストン、プロタミン、硬タンパク質等の単純タンパク質、核タンパク質、糖タンパク質、金属タンパク質等の複合タンパク質等をも検出対象とし、さらにヘモグロビン、ミオグロビンを対象とし、さらに心筋細胞が破壊されて血液中に溶出したヒトミオグロビンを検出する場合に最も適している。ヒトミオグロビンは、例えば、心筋梗塞患者の血液中に含まれる。

40

【0021】

検体試料液とは、いかなる溶液、懸濁液であっても良く、上記タンパク質を含んでいても、含んでいなくても良い。検体試料液として、例えば血液、血清等を挙げることができる。

【0022】

本発明のタンパク質検出方法では、検出対象であるタンパク質と特異的に反応する2種の抗体（第一の感知抗体と標識抗体）と標識抗体と特異的に反応する抗体（第二の感知抗体）とを用いる。

50

【0023】

第一の感知抗体と標識抗体は、各々同一の検出対象のタンパク質と特異的に反応することのできる検出対象のタンパク質に対する抗体であり、第一の感知抗体と標識抗体が反応する検出対象のタンパク質上の結合部位は互いに相違する。

【0024】

第一の感知抗体、標識抗体および第二の感知抗体は、いかなる免疫グロブリンクラスに属するものであっても良い。第一の感知抗体、第二の感知抗体及び標識抗体がいずれもモノクローナル抗体であっても良いし、ポリクローナル抗体であっても良い。また、第一の感知抗体、第二の感知抗体及び標識抗体のうちのいずれかをモノクローナル抗体とし、残りをポリクローナル抗体とすることもできる。

10

【0025】

第一の感知抗体は、抗原であるタンパク質と特異的に反応する哺乳動物の抗体であればいかなるものであっても良い。タンパク質がヒトミオグロビンである場合、第一の感知抗体は抗ヒトミオグロビン抗体であり、好ましくは抗ヒトミオグロビンマウス抗体、抗ヒトミオグロビンウサギ抗体、抗ヒトミオグロビンロバ抗体、抗ヒトミオグロビンラット抗体、抗ヒトミオグロビンヒツジ抗体、抗ヒトミオグロビンブタ抗体、抗ヒトミオグロビンハムスター抗体、抗ヒトミオグロビンリス抗体、抗ヒトミオグロビンシカ抗体、抗ヒトミオグロビンウシ抗体、抗ヒトミオグロビンウマ抗体、抗ヒトミオグロビンモルモット抗体および抗ヒトミオグロビンヤギ抗体のうちのいずれかである。

【0026】

標識抗体は、抗原であるタンパク質と第一の感知抗体が反応するタンパク質上の結合部位と異なる部位に特異的に反応する哺乳動物の抗体であればいかなるものであっても良い。タンパク質がヒトミオグロビンであり、第一の感知抗体が抗ヒトミオグロビンマウス抗体である場合、標識抗体は、抗ヒトミオグロビンウサギ抗体であることが好ましく、第一の感知抗体が抗ヒトミオグロビンウサギ抗体である場合、標識抗体は、抗ヒトミオグロビンマウス抗体であることが好ましい。

20

【0027】

第二の感知抗体は、抗原である標識抗体と特異的に反応する哺乳動物の抗体であればいかなるものであっても良いが、標識抗体が抗ヒトミオグロビンウサギ抗体である場合は、抗ウサギIgGマウス抗体とすることが好ましい。また、標識抗体を抗ヒトミオグロビンマウス抗体とし、第二の感知抗体を抗マウスIgGウサギ抗体とすることも可能である。

30

【0028】

尚、ウサギとマウス以外の他の哺乳動物としてヤギ、ハムスター、リス、モルモット、ラット、シカ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ロバ等の抗体を用いることも可能である。

【0029】

標識物質は、免疫学的測定法に使用し得るものであればいかなるものを用いても良いが、例えば、酵素としてはペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ウレアーゼ、ガラクトシダーゼ、フィコエリトリン、フィコビリプロテイン、アロフィコシアニン類、金属化合物としてはフェリチン、金属コロイド、コロイド超常磁性粒子等を使用することができる。金属コロイドとしては、例えば、金コロイド粒子、銀コロイド粒子、鉄コロイド粒子等を挙げることができる。中でも標識物質は、金コロイド粒子とすることが最も好ましい。

40

【0030】

標識物質が担持された標識抗体は、例えば、標識物質の表面に標識抗体を化学反応または物理的吸着方法で重合させることにより作製される。

【0031】

標識物質が担持された標識抗体は、溶液、懸濁液、粉末状のいかなる形態でもタンパク質試料と混合させることができる。例えば標識抗体を水に溶かして水溶液の形態でタンパク質試料と混合させても良いし、また、粉末状の標識抗体をスポンジ等に含ませておき、これに試料液を浸潤させるようにしても良い。粉末状の標識抗体を得るためには、いかなる

50

方法を用いても良いが、好ましくは標識抗体を含む溶液または懸濁液を乾燥凝固することにより行う。このとき再水和時の凝集を低減するために、例えば特表平10-500990号公報に記載されているように標識抗体を含む溶液または懸濁液に所定量のトレハロース等の添加剤を添加し、これを乾燥凝固することにより標識物質が担持された粉末状の標識抗体を得ても良い。

【0032】

多孔質部材としては、例えば、スポンジ、紙、不織布等を挙げることができる。

【0033】

第一の感知抗体及び第二の感知抗体は、微小流路の周壁に固定化される。これらの感知抗体の固定化は、好ましくは微小流路の周壁に形成されたベース材上に化学的又は物理化学的に被着させることにより行う。化学的な方法としては、例えば、ベース材として有機膜を使用し、感知抗体を所定の反応条件下で反応させることにより行うことが可能である。

10

【0034】

ベース材は、種々の有機膜または無機膜を用いることができ、例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアクリロニトリル、ポリプロピレン、ふっ素樹脂、架橋デキストラン、アガロース、ポリサッカライド、ニトロセルロース等の高分子、紙、ガラス、金属及びこれらを組み合わせて用いる。

【0035】

以上説明したようにタンパク質試料と標識抗体とを混合し、さらに第一および第二の感知抗体と流動接触反応させると、先ずタンパク質を介して標識抗体と第一の感知抗体とが結合してサンドイッチ状の複合体が形成され、次いで標識抗体と第二の感知抗体とが直接結合して複合体が形成される。

20

【0036】

タンパク質の検出は、好ましくは表面プラズモン共鳴質量分析装置を用いて複合体を検出し、第一の感知抗体-タンパク質-標識抗体複合体および第二の感知抗体-標識抗体複合体を測定することでおこなう。

【0037】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を図面を用いてより詳しく説明する。

【0038】

標識物質として金コロイドを用いた場合、検出装置として表面プラズモン共鳴質量分析装置を用いることが最も好ましい。以下、この理由を図6を用いて説明する。

30

【0039】

表面プラズモン共鳴質量分析装置(特願2001-232154に記載)を用いて、種々のヒトミオグロビン濃度における複合体の反射角度変位量を測定した。

【0040】

標識タンパク質を担持させた標識抗体と、担持させない標識抗体とを用意した。微小反応器(マイクロリアクター)の流路内でヒトミオグロビンと標識抗体とを混合反応させ、次いで第一の感知抗体と反応させ、タンパク質を介して標識抗体と感知抗体とが結合したサンドイッチ状の複合体を形成した。なお、標識抗体と感知抗体とは、タンパク質の添加量に対して過剰に加えた。

40

【0041】

ヒトミオグロビンは、コスモバイオ社販売のヒトミオグロビンを用い、第一の感知抗体には、コスモバイオ社販売の抗ヒトミオグロビンマウス抗体を用いた。標識抗体には、コスモバイオ社販売の抗ヒトミオグロビンウサギ抗体を用い、標識物質には、金コロイドを用いた。金コロイドが担持された抗ヒトミオグロビンウサギ抗体を含む水溶液には、PBSを使用し、金コロイドを担持しない抗ヒトミオグロビンウサギ抗体を含む水溶液にもPBSを使用した。

【0042】

反応させたヒトミオグロビン濃度に対する得られた複合体の表面プラズモン共鳴を起こす

50

反射角度変位量を表面プラズモン共鳴質量分析装置により測定した。

金コロイドが担持された標識抗体を用いて得られた結果を図6の(a)に、金コロイドが担持されない標識抗体を用いて得られた結果を図6の(b)に示す。図6における縦軸は、表面プラズモン共鳴を起こす反射角度変位量(m d e g r e e (1 0 ⁻³ 度))であり、横軸は、反応させたヒトミオグロビンの濃度である。

【0043】

図6の(a)に示すように、金コロイド標識を用いた場合、ヒトミオグロビンが100 ng/ml以下の低濃度であっても、高感度で検出されることが確認された。また、ヒトミオグロビン濃度と反射角変位量との関係は、ほぼ1:1の比例の関係であることも確認された。一方、図6の(b)に示すように、金コロイド標識を用いなかった場合、金コロイド標識を用いた場合に比較して検出感度が低くなった。さらに、ヒトミオグロビン濃度と反射角変位量とは比例関係になかった。

10

【0044】

従って、タンパク質濃度を高感度で検出するためには、標識物質として金コロイドを用い、表面プラズモン共鳴質量分析装置を使用することが最も好ましい。

【0045】

図1は、本発明のタンパク質検出方法を説明するための概念的なフローチャート図である。

【0046】

始めに、検体試料液と試薬液を混合する。検体試料液には、検出対象となるタンパク質1が含まれる場合(例えば心筋梗塞患者の血液)と含まれない場合(例えば健常者の血液)がある。以下、検体試料液に対象タンパク質1が含まれる場合を説明する。試薬液には、タンパク質1と特異的に反応する標識抗体2が所定量含まれる。図1の(a)に示すように、標識抗体2の尾部には、標識物質3が担持されている。

20

【0047】

検出試料液と試薬液とが混合されると、タンパク質1と標識抗体2は、図1の(b)に示すように反応し、結合して複合体を形成する。検体試料液に含まれるタンパク質1の量が試薬液に含まれる標識抗体2の量よりも少ない場合、タンパク質1と反応しない標識抗体2が混合液中に残る。

【0048】

続いて、混合液をベース材5に流動接触させる。ベース材5には、タンパク質1と特異的に反応する第一の感知抗体4が固定化される。感知抗体4の固定化には化学的な方法を用いても良いし、物理的な方法を用いても良い。混合液をベース材5に接触させることにより、タンパク質1と第一の感知抗体4とが反応し、図1の(c)に示すように、タンパク質1を介して、標識物質3を担持する標識抗体2と第一の感知抗体4とがサンドイッチ状に結合する複合体を形成する。

30

【0049】

引き続き、混合溶液をベース材7に流動接触させる。ベース材7には、標識抗体2と特異的に反応する第二の感知抗体6が固定化される。感知抗体6の固定化には化学的な方法を用いても良いし、物理的な方法を用いても良い。混合液を第二の感知抗体6に接触させることにより、図1の(d)に示すように、タンパク質1と結合していない標識抗体2は、第二の感知抗体6と直接的に反応して複合体を形成する。

40

【0050】

以下、検体試料液中のタンパク質の含有量が異なる種々の場合について図2を用いて説明する。

【0051】

検体試料液中のタンパク質1の含有量が試薬液中の標識抗体2の含有量よりも過剰か、同等である場合は、図2の(a)に示すように、ほとんど全部の標識抗体2は、タンパク質1を介して第一の感知抗体4と反応して複合体を形成する。

【0052】

50

検体試料液中のタンパク質 1 の含有量が試薬液中の標識抗体 2 の含有量よりも少ない場合は、図 2 の (b) に示すように、タンパク質 1 と結合した一部の標識抗体 2 のみが第一の感知抗体 4 と反応結合し、タンパク質 1 と結合していない残りの標識抗体 2 は第一の感知抗体 4 と反応することなくそのまま通過した後に第二の感知抗体 6 と反応結合する。

【 0 0 5 3 】

検体試料液にタンパク質 1 が含まれない場合は、図 2 の (c) に示すように、実質的に全部の標識抗体 2 が第二の感知抗体 6 のみと反応結合する。

【 0 0 5 4 】

このようにして得られた第一の複合体と第二の複合体とに検出光をそれぞれ照射して、各々の複合体に含まれる標識物質 3 をそれぞれ検出する。これにより、検体試料液中のタンパク質 1 の有無及び含有量の相対的および / または絶対的な量を検出・測定することが可能となる。

10

【 0 0 5 5 】

(第 1 の実施形態)

図 3 は、本発明に係るタンパク質検出装置の一例としてのタンパク質検出キットを示す平面模式図である。タンパク質検出キットの主要部は、微小反応器 (マイクロリアクター) 1 5 からなり、微小反応器 1 5 の上流側流路 1 3 , 1 4 はアダプタの液溜め 1 1 , 1 2 にそれぞれ連通可能となっている。一方の液溜め 1 1 は検体試料液 (採取血液) を送液するための圧送ポンプ (図示せず) に連通している。他方の液溜め 1 2 は試薬液を送液するための圧送ポンプ (図示せず) に連通している。2つの微小流路 1 3 , 1 4 は混合部 1 7 の流路 1 6 にて合流している。混合部 1 7 は短くなりすぎないようにすることが好ましく、検体試料液と試薬液が十分に混合され得るように蛇行させるようにしても良い。微小流路 1 6 内には、混合部 1 7 の下流に第一の反応部 1 8 が設けられ、そのさらに下流に第二の反応部 1 9 が設けられる。第一の反応部 1 8 はベース材 5 を具備し、このベース材 5 には第一の感知抗体 4 が固定化されている。第二の反応部 1 9 はベース材 7 を具備し、このベース材 7 には第二の感知抗体 6 が固定化されている。微小流路 1 6 下流側の排出部 2 0 には、混合液の残部廃液を吸引し、排出するための吸引ポンプ (図示せず) が設けられる。表面プラズモン共鳴質量分析装置 2 1 は、ベース材 5 , 7 上に形成された複合体に含まれる標識物質 3 を検出し得るように微小反応器 1 5 に設置される。表面プラズモン共鳴質量分析装置 2 1 にはデータ処理装置 2 2 が接続され、装置 2 1 から入力される検出データと所定の算式とを用いて装置 2 2 により反射角度変位量が算出されるようになっている。

20

30

【 0 0 5 6 】

第一および第二の反応部 1 8 , 1 9 の微小流路 1 6 の周壁は光を透過する透明体材料であることが好ましく、一般的にはガラスや樹脂を用いる。

【 0 0 5 7 】

微小流路 1 3 , 1 4 , 1 6 は、例えば、ガラス板にパターンエッチング加工を施し溝路を形成し、これにさらにもう 1 枚のエッチング加工していないガラス板を重ね合わせることで作り出すことができる。なお、上流側の微小流路 1 3 , 1 4 は、微小反応器 1 5 の内部に設けるようにしても良いし、外部アダプタに設けるようにしても良い。

【 0 0 5 8 】

微小流路 1 3 , 1 4 , 1 6 は、幅 2 0 ~ 5 0 0 μm 、深さ 2 0 ~ 1 0 0 μm の矩形断面又は円形断面とすることが好ましい。この場合に、流路幅は 1 0 0 \pm 2 0 μm とすることが望ましい。混合部 1 7 の長さは、1 ~ 2 0 mm とすることが好ましい。

40

【 0 0 5 9 】

ベース材 5 の長さおよびベース材 7 の長さは、1 0 0 ~ 5 0 0 μm とすることが好ましい。ベース材 5 とベース材 7 との間は、2 0 0 μm 以上離れていることが好ましい。

【 0 0 6 0 】

ベース材 5 , 7 は、例えば、CVD、PVDまたはフォトリソグラフィの技術を用いて微小流路 1 6 の一部にパターン成膜することにより形成する。

【 0 0 6 1 】

50

ベース材 5, 7 の表面は、ベース材と検体試料液、試薬液等に含まれる物質等との非特異的な反応を避けるために適当な物質でコーティングすることも可能である。

【0062】

圧送ポンプには、マイクロポンプを用いることが望ましく、マイクロポンプの吐出圧力は $10 \sim 200 \text{ kgf/cm}^2$ とすることが望ましい。吸引ポンプには、マイクロポンプを用いることが望ましく、マイクロポンプの吸引圧力は $10 \sim 200 \text{ kgf/cm}^2$ とすることが望ましい。

【0063】

検出装置は表面プラズモン共鳴質量分析装置が好ましい。表面プラズモン共鳴質量分析装置には、例えば、特願 2001-232154 記載の装置を用いる。

10

【0064】

次に作用について説明する。液溜め 11 を介して検体試料液を一方の微小流路 13 に送給する。また、液溜め 12 を介して標識抗体 2 を含む試薬液を他方の微小流路 14 に送給する。検体試料液と試薬液とは混合部 17 で合流し混合される。各液の送液圧力を所定の範囲に制御し、混合部 17 の流路 16 の行程を所定長さ以上に設定することにより、タンパク質 1 と標識抗体 2 との反応が十分に進行するだけの時間をかせぐことができる。検体試料液と試薬液との混合液は、引き続き微小流路 16 内を通流し、第一の反応部 18 において第一の感知抗体 4 と流動接触する。引き続き、混合試料は、第二の反応部 19 において、第二の感知抗体 6 と流動接触する。混合液の流速を圧送ポンプ（図示せず）により所定の範囲に制御することにより、第一の感知抗体 4 とタンパク質 1 との反応、第二の感知抗体 6 と標識抗体 2 との反応がそれぞれ十分に進行し得る時間、混合液とベース材 5, 7 とを接触させることが可能となる。この後、混合液の残部廃液を排出部 20 から吸引ポンプ（図示せず）により吸引・排出する。混合液が反応部 18, 19 を通過した後、第一の反応部 18 のベース材 5 および第二の反応部 19 のベース材 7 上に形成された複合体に含まれる標識物質 3 の量を表面プラズモン共鳴質量分析装置 21 により測定する。表面プラズモン共鳴質量分析装置 21 の測定結果の電子データは、データ処理装置 22 へと送られ、処理される。この処理結果により検体試料液中のタンパク質 1 の含有量を検出することが可能となる。

20

【0065】

（第 2 の実施形態）

図 4 は、第 2 の実施形態のタンパク質検出装置としてのタンパク質検出キットを示す模式図である。タンパク質検出キットは、検体試料を標識抗体 2 と混合するための液溜め 31 を有する。液溜め 31 にはスポンジのような多孔質部材 32 が設けられている。この多孔質部材 32 には、標識物質 3 が担持された粉末状の標識抗体 2 が予め含浸される。多孔質部材 32 は例えばスポンジ、紙、不織布等を用いることが好ましい。また、液溜め 31 には、展開液を送給するための圧送ポンプ（図示せず）が流路に連通している。さらに、液溜め 31 は、微小反応器 15 内の反応流路 16 に連通している。なお、反応流路 16 から下流側の構成は上記第 1 実施形態と実質的に同じである。

30

【0066】

次に作用について説明する。液溜め 31 中の多孔質部材 32 に検体試料液を添加する。これにより多孔質部材 32 に含浸された標識抗体 2 は、検体試料液の浸透により溶解される。次いで液溜め 31 に展開液を送給する。展開液には例えば水を用いる。展開液は圧送ポンプ（図示せず）により送給され、液溜め 31 の多孔質部材 32 内を通過する際に、検体試料と標識抗体 2 との混合が促進される。さらに、展開液がキャリアとなって、検体試料と標識抗体 2 の混合液は展開液と共に微小反応器 15 の微小流路 16 に送液される。第 1 および第 2 の反応部 18, 19 では上記第 1 実施形態と同様に検出動作する。

40

【0067】

尚、検体試料液と展開液を共に液溜め 31 に入れ、この混合液を送給し、多孔質部材 32 に通過させることも可能である。

【0068】

50

以下、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれらに限られるものではない。

【0069】

(実施例1)

図3のタンパク質検出キットを用いて以下のように心筋梗塞患者の血液サンプルに含まれるヒトミオグロビンの検出を行った。

【0070】

検出試料液として心筋梗塞重症患者であることが事前に判明している被験体から採取した血液サンプルAを用いた。第一の感知抗体4には抗ヒトミオグロビンマウス抗体、標識抗体2にはあらかじめ標識キットで金コロイド標識した抗ヒトミオグロビンウサギ抗体、第二の感知抗体6には抗ウサギIgGマウス抗体をそれぞれ用いた。抗ヒトミオグロビンマウス抗体4、抗ヒトミオグロビンウサギ抗体2、抗ウサギIgGマウス抗体6は、それぞれコスモバイオ社販売の抗体を用いた。金コロイドが担持された抗ヒトミオグロビンウサギ抗体2を含む水溶液にはPBSを使用した。

10

【0071】

石英ガラス板にエッチングを施すことにより幅 $100 \pm 10 \mu\text{m}$ 、深さ $50 \mu\text{m}$ の矩形断面のパターン溝を作製し、これに石英ガラス板を重ね合わせるにより微小流路13, 14, 16を作製した。微小流路16の混合部17の行程は 10mm とした。微小流路16には、ベース材5, 7としてニトロセルロース膜をCVD法により成膜した。ベース材5, 7は長さ $100 \mu\text{m}$ とし、膜厚 $0.1 \mu\text{m}$ とした。ベース材5とベース材7との間の距離は、 $200 \mu\text{m}$ となるようにした。ベース材5, 7には、第一の感知抗体4、第二の感知抗体6をそれぞれ以下のように固定化した。

20

【0072】

ベース材を10%(V/V)メタノールで30分間処理した後、空気中で乾燥させた。その後ベース材を0.5%(V/V)グルタルアルデヒド溶液に漬け、表面を1時間処理した後、脱イオン水で徹底洗浄した。乾燥させた後、ベース材上の一定部位に 10mM リン酸緩衝液で希釈した感知抗体溶液(それぞれ 0.5mg/ml) $2.5 \mu\text{l}$ を添加した後、100%の湿度を維持できる密閉された箱に入れ、37℃で1時間反応させ、感知抗体を固定させた。

【0073】

液溜め11に検体試料液 $20 \mu\text{l}$ を注入し、液溜め12に試薬液($200 \mu\text{g/ml}$) $20 \mu\text{l}$ を注入した。これらの試料液をそれぞれの液溜め11, 12に接続されたマイクロポンプにより吐出量 $5 \mu\text{l/min}$ で微小流路に送給した。微小流路16の排出部20では、マイクロポンプにより吸引量 $5 \mu\text{l/min}$ で、微小流路16内の混合液の残部廃液を吸引排出した。

30

【0074】

反応終了後、ベース材5, 7上に被着された抗ヒトミオグロビンマウス抗体4と金コロイドが担持された抗ヒトミオグロビンウサギ抗体2とがヒトミオグロビン1を介して結合し複合化した複合体に含まれる金コロイド3の表面プラズモン共鳴を起こす反射角度変位量と、抗ウサギIgGマウス抗体6と金コロイド3が担持された抗ヒトミオグロビンウサギ抗体2とが直接結合し複合化した複合体の表面プラズモン共鳴を起こす反射角度変位量とをそれぞれ測定した。

40

【0075】

血液サンプルAを用いた実施例1では、図5の(a)に示すように、第一の反応部18では中点IIにピークを生じ、第二の反応部19では中点Vにピークを生じるが、前者の方が後者よりピーク高さが高くなった。これは、血液中のヒトミオグロビン含有量が試薬液中の抗ヒトミオグロビンウサギ抗体含有量よりも多いか同等であったため、図2の(a)に示すような状態となり、このような結果が得られたものと考えられる。

【0076】

ただし図5における縦軸は、表面プラズモン共鳴を起こす反射角度変位量(m degree)である。横軸は、図3中の第一の反応部18の始点をI、中点をII、終点をIII

50

で示し、第二の反応部 19 の始点を I V、中点を V、終点を V I でそれぞれ示した。

【0077】

また、図 5 の結果より、各血液サンプル中のヒトミオグロビン含有量を検出することも可能である。これは、図 6 の (a) で示したように、金コロイド標識を用いれば検体試料液中に含有されるヒトミオグロビンが 100 ng / ml 以下の低濃度であっても、高感度で検出可能であり、ヒトミオグロビン濃度と反射角変位量との関係がほぼ 1 : 1 の比例関係となるためである。このため、図 6 の (a) の検量線を用いることにより、図 5 に示す反射角度変位量からヒトミオグロビン濃度を高精度で算出することが可能となる。なお、反射角度変位量からのヒトミオグロビン濃度の算出は、データ処理装置 22 によって行うことが可能である。

10

【0078】

(実施例 2)

検出試料液を心筋梗塞軽症患者であることが事前に判明している被験体から採取した血液サンプル B とした。それ以外は、上記実施例 1 と同様にヒトミオグロビンの検出を行った。

【0079】

血液サンプル B を用いた実施例 2 では、図 5 の (b) に示すように、第一の反応部 18 の角度変位量ピーク値は、第二の反応部 19 の角度変位量ピーク値より低くなった。これは、血液中のヒトミオグロビン含有量が試薬液中の抗ヒトミオグロビンウサギ抗体含有量よりも少なかったため、図 2 の (b) に示すような状態となり、このような結果が得られたものと考えられる。

20

【0080】

(実施例 3)

検出試料液を心筋梗塞でない健常者であることが事前に判明している被検体から採取した血液サンプル C とした。それ以外は、上記実施例 1 と同様にヒトミオグロビンの検出を行った。

【0081】

血液サンプル C を用いた実施例 3 では、図 5 の (c) に示すように、第一の反応部 18 ではヒトミオグロビンが検出されず、第二の反応部 19 のみでヒトミオグロビンが検出された。これは、血液中にヒトミオグロビンが含まれなかったため、図 2 の (c) に示すような状態となり、このような結果が得られたものと考えられる。

30

【0082】

【発明の効果】

以上示したように本発明によれば、血液中に含まれるヒトミオグロビン量を検出することが可能であり、検出されたヒトミオグロビン量から被験者の心筋梗塞の度合いを調べることができる。また、血液中にヒトミオグロビンを含まないことも明確に検出することが可能であるため、これにより心筋梗塞のない健常者であるかどうかを調べることも可能となる。

【0083】

また、本発明によれば血液中に含有されるヒトミオグロビンが 100 ng / ml 以下の低濃度であっても、高感度に検出することが可能である。

40

【0084】

このため、臨床医療現場において簡便に使用することができ、短時間で高感度に対象タンパク質を検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 (a) ~ (d) は本発明のタンパク質検出方法を模式的に示すフローチャート。

【図 2】 (a) ~ (c) は本発明のタンパク質検出方法により得られる重症患者、軽症患者、健常者の複合体をそれぞれ示す模式図。

【図 3】本発明の第一実施形態に係るタンパク質検出キットの概略断面図。

【図 4】本発明の第二実施形態に係るタンパク質検出キットの概略断面図。

50

【図5】表面プラズモン共鳴質量分析装置の測定結果を示す特性線図。

【図6】(a)は金コロイド標識を用いたミオグロビンの検量線図、(b)は金コロイド標識を用いないミオグロビンの検量線図。

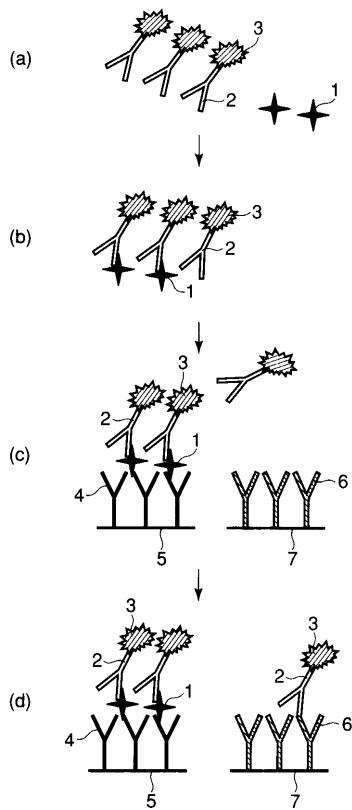
【符号の説明】

- 1 ... タンパク質 (ヒトミオグロビン)
- 2 ... 標識抗体 (抗ヒトミオグロビンウサギ抗体)
- 3 ... 標識物質 (金コロイド)
- 4 ... 第一の感知抗体 (抗ヒトミオグロビンマウス抗体)
- 5, 7 ... ベース材
- 6 ... 第二の感知抗体 (抗ウサギIgGマウス抗体)
- 11, 12 ... 液溜め
- 13, 14, 16 ... 微小流路
- 15 ... 微小反応器
- 17 ... 混合部
- 18 ... 第一の反応部
- 19 ... 第二の反応部
- 20 ... 排出部
- 21 ... 表面プラズモン共鳴質量分析装置
- 22 ... データ処理装置
- 31 ... 液溜め
- 32 ... 多孔質部材

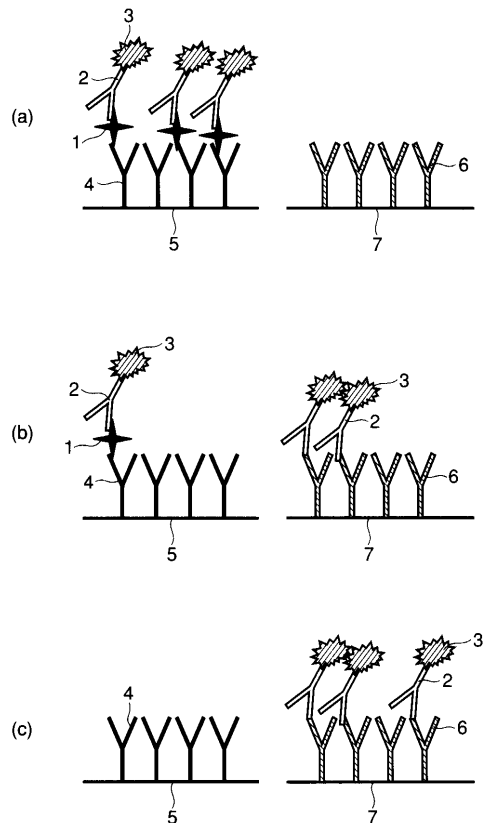
10

20

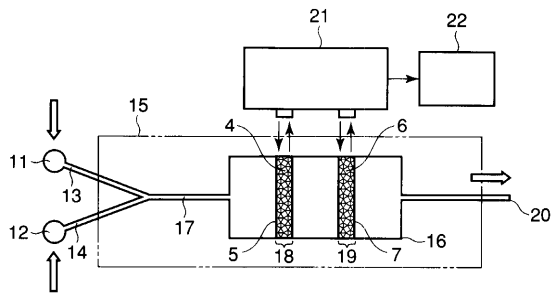
【図1】



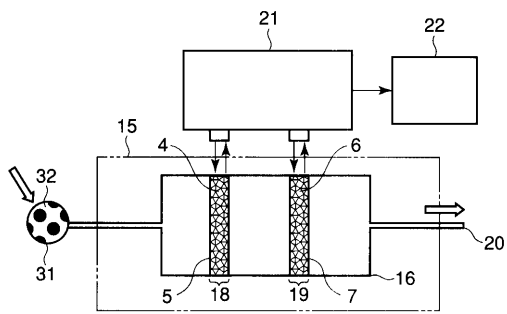
【図2】



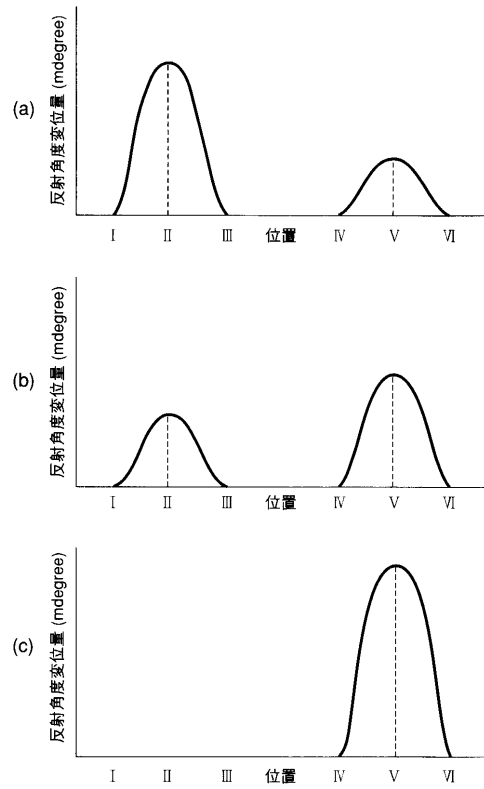
【 図 3 】



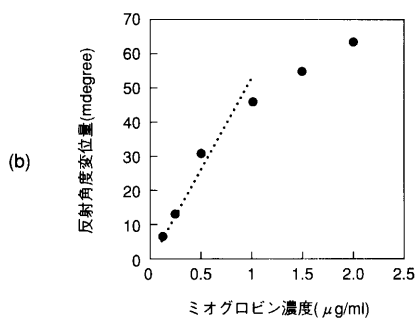
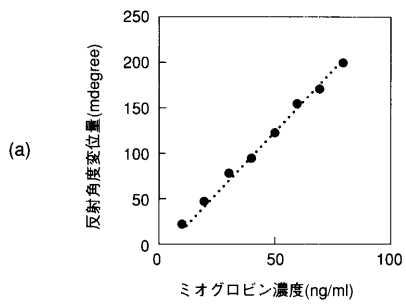
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

- (72)発明者 中嶋 祐二
神奈川県横浜市金沢区幸浦一丁目8番地1 三菱重工業株式会社先進技術研究センター内
- (72)発明者 中山 博之
神奈川県横浜市金沢区幸浦一丁目8番地1 三菱重工業株式会社先進技術研究センター内

专利名称(译)	蛋白质检测方法和蛋白质检测装置		
公开(公告)号	JP2004077387A	公开(公告)日	2004-03-11
申请号	JP2002240815	申请日	2002-08-21
[标]申请(专利权)人(译)	三菱重工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	三菱重工业株式会社		
[标]发明人	中嶋祐二 中山博之		
发明人	中嶋 祐二 中山 博之		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N37/00		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/543.595 G01N33/53.D G01N37/00.101		
代理人(译)	坪井淳 河野 哲		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种蛋白质检测方法和装置，能够在临床医学现场方便地使用，并在短时间内以高灵敏度检测蛋白质作为目标。

ŽSOLUTION：制备特定量的标记抗体制造反应，特别是作为检测对象的蛋白质并携带标记物质，并且将含有所述蛋白质的可能性的样品液体与标记的抗体混合，并且将得到的混合液送入微小通道，与固定在微通道内部的第一传感反体流动接触，并使混合液与第二传感反体固定流动接触到了分钟通道的内部。然后将混合液从微小通道排出，并将检测光束投射到具有如此复杂结构的复杂体上，使得标记的抗体通过蛋白质和复合体与第一传感抗体偶联。具有这样的复杂结构，使得标记的抗体与第二传感抗体直接结合，从而检测包含在复合体中的标记物质。Ž

