

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2007/072922

発行日 平成21年6月4日(2009.6.4)

(43) 国際公開日 平成19年6月28日(2007.6.28)

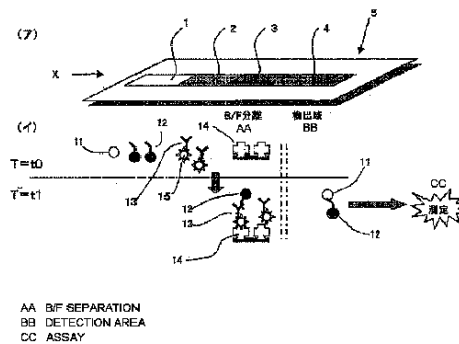
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U	
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 F	
GO 1 N 27/416 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 0 1	
	GO 1 N 27/46 3 3 6 M	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)		

出願番号 特願2007-551157 (P2007-551157)	(71) 出願人 000116024 ローム株式会社 京都府京都市右京区西院溝崎町2 1 番地
(21) 国際出願番号 PCT/JP2006/325539	
(22) 国際出願日 平成18年12月21日(2006.12.21)	
(31) 優先権主張番号 特願2005-369096 (P2005-369096)	(71) 出願人 000144577 株式会社三和化学研究所 愛知県名古屋市東区東外堀町3 5 番地
(32) 優先日 平成17年12月22日(2005.12.22)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	
	(74) 代理人 100094145 弁理士 小野 由己男
	(74) 代理人 100106367 弁理士 稲積 朋子
	(74) 代理人 100117422 弁理士 堀川 かおり
	(72) 発明者 林 陽子 京都府京都市右京区西院溝崎町2 1 ロー ム株式会社内
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫測定装置及び方法

(57) 【要約】

使用方法が簡便、1段階操作、短時間に測定可能で、様々な抗原に対応可能であり、正確かつ迅速な定量分析を実現できる免疫測定装置を提供する。本発明は、(1) 試料中の抗原と、前記抗原に特異的に結合できる標識抗体である第1抗体とを反応させる第1の部位、(2) 抗原と結合していない第1抗体とビオチン又はアビジンを結合させた抗体である第2抗体とを反応させる第2の部位、(3) 第2抗体がビオチン結合抗体の場合はアビジンが、第2抗体がアビジン結合抗体の場合はビオチンが第4の部位に移動できないように固定手段に固定され、第2抗体を前記固定されたアビジン又はビオチンで補足する第3の部位、及び、(4) 抗原と結合した第1抗体の標識物を検出する第4の部位 の4つの部位を有し、第1抗体は、抗体部分がF(a b')フラグメント又は還元IqGで、F(a b')フラグメント又は還元IqGと標識物とが特定の結合比で結合した標識抗体で、第2抗体は、ビオチン又はアビジンを結合させた抗体で、第1抗体に対する抗イディオタイプ抗体でかつ抗原と第1抗体との結合物には結合できない種類の抗イディオタイプ



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の測定対象物である抗原と標識抗体を特異的に結合させて、その結合体の標識物を測定することにより抗原量を測定することが可能な免疫測定装置であって、

1つの装置内に、

(1) 試料中の抗原と、前記抗原に特異的に結合できる標識抗体である第1抗体とを反応させる第1の部位、

(2) 抗原と結合していない第1抗体とビオチン又はアビジンを結合させた抗体である第2抗体とを反応させる第2の部位、

(3) 第2抗体がビオチン結合抗体の場合はアビジンが、第2抗体がアビジン結合抗体の場合はビオチンが第4の部位に移動できないように固定手段に固定され、第2抗体を前記固定されたアビジン又はビオチンで補足する第3の部位、及び、

(4) 抗原と結合した第1抗体の標識物を検出する第4の部位の4つの部位を有し、それぞれの部位を順に溶液が移動できるように構成され、第1抗体は、抗体部分がF (a b ') フラグメント又は還元IgGで、F (a b ') フラグメント又は還元IgGと標識物とが特定の結合比で結合した標識抗体であって、第1の部位又はその隣接部に含まれ、第2抗体は、ビオチン又はアビジンを結合させた抗体で、第1抗体に対する抗イディオタイプ抗体でかつ抗原と第1抗体との結合物には結合できない種類の抗イディオタイプ抗体であって、第2の部位又はその隣接部に含まれている、免疫測定装置。

【請求項 2】

第1抗体が測定対象物に対して過剰量含まれている、請求項1に記載の免疫測定装置。

【請求項 3】

第2抗体が第1抗体に対して過剰量含まれている、請求項1に記載の免疫測定装置。

【請求項 4】

第1抗体が酵素で標識されている、請求項1に記載の免疫測定装置。

【請求項 5】

第1の部位の隣接部に、第1抗体を保持する抗体保持部が連結されてなる、請求項1に記載の免疫測定装置。

【請求項 6】

第4の部位に標識物を検出するための試薬が保持されている、請求項1に記載の免疫測定装置。

【請求項 7】

第4の部位の隣接部に、標識物を検出するための試薬を保持する基質保持部が連結されてなる、請求項1に記載の免疫測定装置。

【請求項 8】

基質保持部に電子伝達メディエータ又は発色基質が保持されてなる、請求項6に記載の免疫測定装置。

【請求項 9】

バイオチップ状の装置であって、4つの部位がそれぞれ微小空間から構成され、固定手段が微粒子であり、第3の部位と第4の部位とが、固定手段である微粒子を通過させないチャンネル部によって分離されている、請求項1に記載の免疫測定装置。

【請求項 10】

第4の部位に、一对の電極が形成されてなる、請求項9に記載の免疫測定装置。

【請求項 11】

試料中の測定対象物である抗原と、前記抗原に特異的に結合する標識抗体である第1抗体とを反応させ、次に未反応の第1抗体をビオチン又はアビジンを結合させた抗体である第2抗体と反応させた後、前記第2抗体を前記第2抗体がビオチン結合抗体の場合はアビジンで、前記第2抗体がアビジン結合抗体の場合はビオチンで捕捉し、捕捉されなかった抗原と第1抗体との結合物を検出する免疫測定方法であって、

前記第1抗体は、抗体部分がF (a b ') フラグメント又は還元 I g G で、F (a b ')

) フラグメント又は還元 I g G と標識物が特定の結合比で結合した標識抗体であり、前記第 2 抗体は、第 1 抗体に対する抗イデオタイプ抗体でかつ抗原と第 1 抗体との結合物には結合できない種類の抗イデオタイプ抗体である、免疫測定方法。

【請求項 1 2】

第 1 抗体を測定対象物に対して過剰量使用する、請求項 1 1 に記載の免疫測定方法。

【請求項 1 3】

第 2 抗体を第 1 抗体に対して過剰量使用する、請求項 1 1 に記載の免疫測定方法。

【請求項 1 4】

測定対象物の検出を電気化学的又は光学的に行う、請求項 1 1 に記載の免疫測定方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、臨床検査等の分野で利用される免疫測定装置に関するものであり、簡便、迅速かつ高感度に、検体中の測定対象物を定量的に測定できる免疫測定装置に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

血液、尿などの生体試料中に含まれる物質を測定する方法として、使用方法が簡便で短時間で測定できる簡易型の免疫測定装置が開発されている。近年、この装置は、緊急検査、ベッドサイド等での検査などに広く使用されるようになって、その重要性、有用性が増大してきた。

20

【0 0 0 3】

簡易型の免疫測定装置としては、イムノクロマト法、フロースルー法、免疫センサ法等を原理とした測定装置が知られている。これらの装置に用いられている方法は、試料を添加後、抗原抗体反応を行いつつ溶液が担体上を上下又は左右に移動して、最終的に測定対象物量に相当するシグナルが得られるという原理に基づいており、その構造も比較的簡単である。シグナルの検出法は、抗体に金コロイドや着色ラテックスに代表される着色粒子を標識して、検出ラインや検出面の呈色を読みとる方法が一般的に用いられている。この他にも、測定操作が複雑になるが、酵素反応による呈色等も利用されている。

【0 0 0 4】

これらの簡易型の免疫測定装置は、基本的に測定対象物の有無を判定するための定性用として利用されている。しかし、近年、より有益な診断を実施するために、これらの装置を利用した定量化の試みがなされている。これらの試みは、測定後の検出ラインの色調が、測定対象物の量（濃度）に依存して変化することに基づいている。具体的には、検出ラインの色調を判読する方法として、反射率計で測定する方法、CCDイメージセンサで画像解析する方法（特開平 8-334511、特開 2000-266751）、電気伝導度による方法（特開 2001-337065）などが開発されている。

30

【0 0 0 5】

また、同様の免疫測定装置において、全標識抗体のうち、未反応の標識抗体を捕捉し、捕捉されなかった標識抗体（すなわち、反応した標識抗体）を測定するという方法に関する装置を開示する先行技術がある。例えば、US 5705338号、特開平 4-16745号、特開 2003-262636号等である。しかし、これらの測定装置は、十分な定量性を備えていない。更に、同様の先行技術で、抗イデオタイプ抗体の使用については、特開平 7-151757 に開示されている。

40

【0 0 0 6】

近年、さらに Lab on Chip と呼ばれる技術が注目されている。この技術は、分析する対象の種類によって、臨床分析チップ、環境分析チップ、遺伝子分析チップ（DNA チップ）、たんぱく質分析チップ（プロテオームチップ）、糖鎖チップ、クロマトグラフチップ、細胞解析チップ、製薬スクリーニングチップなどと称される数センチの大きさの基板（バイオチップ）上で混合、反応、分離、測定及び検出等を行うものである。例えば、このマイクロチップ上で、各種の抗原-抗体反応による免疫分析を行う方法が特開 2001-

50

4628に記載されている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上述した定量化の試みは、定性用の装置から得られた検出結果を機器で測定して定量化しようとする応用検討したものである。そのため、呈色の色調又は強度差が微妙であり、定量範囲が狭く、十分な定量性が確保されているとは言い難い。検出方法に酵素反応を利用した場合は、定量化や高感度化に対して有効であるが、洗浄操作や試液の添加等の操作が必要になり、バックグラウンド上昇等の課題もある。

【0008】

また、上述したマイクロチップでは、洗浄操作が必要であったり、反応を行う部位に複数の溶液を供給して反応させる等の煩雑な工程が必要で、測定に長時間を要するという問題がある。さらに、複数の注入部及び導入部を必要とし、チップの占有面積が大きくなり、小型で簡易なマイクロチップとすることができないという問題もある。

【0009】

本発明は上記した問題点に鑑みてなされたものであり、本発明の目的は、簡易型の免疫測定装置の長所、すなわち、使用方法が簡便、1段階操作、短時間に測定可能等の性質をそのまま有すると共に、様々な抗原に対応可能であり、正確かつ迅速な定量分析を実現できる免疫測定装置を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、装置内に4つの異なる部位を有した装置として構成することによって、正確かつ迅速な定量分析を実現できる免疫測定を行うことができることに想到し、本発明を完成させた。

【0011】

すなわち本発明は、試料中の測定対象物である抗原と第1抗体を特異的に結合させて、その結合体の標識物を測定することにより抗原量を測定することが可能な免疫測定装置であって、1つの装置内に、(1)試料中の抗原と、前記抗原に特異的に結合できる標識抗体である第1抗体とを反応させる第1の部位、(2)抗原と結合していない第1抗体とビオチン又はアビジンを結合させた抗体である第2抗体とを反応させる第2の部位、(3)第2抗体がビオチン結合抗体の場合はアビジンが、第2抗体がアビジン結合抗体の場合はビオチンが第4の部位に移動できないように固定手段に固定され、第2抗体を前記固定されたアビジン又はビオチンで補足する第3の部位、及び、(4)抗原と結合した第1抗体の標識物を検出する第4の部位の4つの部位を有し、それぞれの部位を順に溶液が移動できるように構成され、第1抗体は、抗体部分がF(a b')フラグメント又は還元IgGで、F(a b')フラグメント又は還元IgGと標識物とが特定の結合比で結合した標識抗体であって、第1の部位又はその隣接部に含まれ、第2抗体は、ビオチン又はアビジンを結合させた抗体で、第1抗体に対する抗イデオタイプ抗体でかつ抗原と第1抗体との結合物には結合できない種類の抗イデオタイプ抗体であって、第2の部位又はその隣接部に含まれている免疫測定装置である。

【0012】

本発明の免疫測定装置では、第1抗体は測定対象物に対して過剰量含まれていることが好ましく、第2抗体も第1抗体に対して過剰量含まれていることが好ましい。第1抗体は、例えば、酵素で標識することができる。また、第1抗体は、第1の部位の隣接部に抗体保持部を設けて、そこに保持させてもよい。

【0013】

標識物を検出するための試薬は、第4の部位に保持しておくことができる。また、当該試薬は、第4の部位の隣接部に基質保持部を設けて、ここに保持しておくこともできる。当該試薬としては、電子伝達メディエータ又は/及び発色基質等を例示することができる。基質保持部とは、標識物を検出するための試薬の全部又は一部を、予め又はその使

10

20

30

40

50

用直前に保持させておく部位である。

【0014】

本発明の免疫測定装置は、バイオチップ状の装置とすることもできる。この場合、4つの部位はそれぞれ微小空間から構成され、固定手段としては例えば微粒子を使用することができ、第3の部位と第4の部位とを、固定手段である微粒子を通過させないチャンネル部によって分離する形態とすることができる。このようなバイオチップ状の装置においては、第4の部位に一对の電極を形成して、電気化学的方法で標識物を検出することができる。

【0015】

本発明はまた、試料中の測定対象物である抗原と、前記抗原に特異的に結合する標識抗体である第1抗体とを反応させ、次に未反応の第1抗体をビオチン又はアビジンを結合させた抗体である第2抗体と反応させた後、前記第2抗体を前記第2抗体がビオチン結合抗体の場合はアビジンで、前記第2抗体がアビジン結合抗体の場合はビオチンで捕捉し、捕捉されなかった抗原と第1抗体との結合物を検出する免疫測定方法であって、前記第1抗体は、抗体部分がF(a b')フラグメント又は還元IgGで、F(a b')フラグメント又は還元IgGと標識物とが特定の結合比で結合した標識抗体であり、前記第2抗体は、第1抗体に対する抗イディオタイプ抗体でかつ抗原と第1抗体との結合物には結合できない種類の抗イディオタイプ抗体である免疫測定方法にも係る。

【0016】

本発明の免疫測定方法においては、やはり、第1抗体を測定対象物に対して過剰量添加使用することが好ましく、第2抗体も第1抗体に対して過剰量使用することが好ましい。また、測定対象物の検出は、電気化学的又は光学的に行うのが好ましい。

【発明の効果】

【0017】

本発明の免疫測定装置は、簡便な操作で迅速かつ高感度に定量的な測定を可能にする。特に、ビオチン-アビジンの結合性を利用することにより、より短時間での測定が可能である。従って、緊急検査やベッドサイド検診に利用でき、医療分野に於ける有用性は極めて高い。また、様々な測定対象抗原に対して容易に応用でき、汎用性が高い。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】本発明のテストストリップ状の装置の一実施形態を示す平面図である。
 【図2】本発明のテストストリップ状の装置の別の実施形態を示す平面図である。
 【図3】本発明のバイオチップ状の装置の一実施形態を示す平面図及び断面図である。
 【図4】本発明のバイオチップ状の装置の別の実施形態を示す平面図及び断面図である。
 【図5】本発明のバイオチップ状の装置のさらに別の実施形態を示す平面図及び断面図である。
 【図6】試験例1で得られた反射率とヒトCRPの濃度との関係を示す検量線である。
 【図7】試験例2で得られた吸光度変化率とヒトCRPの濃度との関係を示す検量線である。

【図8】本発明の測定原理を簡潔に示す図である。

【符号の説明】

【0019】

- 1 第1の部位
- 2 第2の部位
- 3 第3の部位
- 4 第4の部位
- 5 装置
- 6 支持体
- 11 抗原
- 12 第1抗体(標識抗体)

1 3 第2抗体

1 4 第2抗体がビオチン結合抗イディオタイプ抗体の場合はアビジン、第2抗体がアビジン結合抗イディオタイプ抗体の場合はビオチン

1 5 第2抗体がビオチン結合抗イディオタイプ抗体の場合はビオチン、第2抗体がアビジン結合抗イディオタイプ抗体の場合はアビジン

3 1 微小流路

3 2 チャネル部

3 3 注入口

4 1 微粒子

4 2 抗体保持部

4 3 基質保持部

5 1 電極

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

以下に本発明を更に詳細に説明する。

【0021】

本発明は、試料中の測定対象物である抗原と第1抗体を特異的に結合させて、その結合体の標識物を測定することにより抗原量を測定することが可能な免疫測定装置であって、以下の4つの部位を有し、それぞれの部位を順に溶液が移動できるように構成されている。

20

【0022】

第1の部位は、試料中の抗原と、前記抗原に特異的に結合できる第1抗体とを反応させる部位である。試料溶液は、直接当該部位に添加することもできるし、上流部に試料添加部を設置して、第1の部位に試料溶液が移動するように構成することもできる。この第1の部位では、試料溶液添加後、第1抗体及び抗原と第1抗体の結合物は、保持されることなく第2の部位へ移動する。第1抗体は、試料中の測定対象物である抗原に対するモノクローナル抗体のF (a b') フラグメント又は還元IgGに、通常の免疫測定法に利用されている様々な標識物を結合させたもので、F (a b') フラグメント又は還元IgGと標識物が特定の結合比、即ち、1 : 1乃至1 : n (nは整数、ただし、1 ~ 10が好ましい) のいずれかで結合した抗体であり、第1の部位又はその隣接部に含まれている。尚、モノクローナル抗体のF (a b') フラグメント化やF (a b') フラグメントへの標識物の結合は、公知の方法が利用できる。さらに、最終結合物に混入する未反応の酵素又は未標識の抗体は、精製によって完全に除去しておくことが好ましい。

30

【0023】

本装置においてこのような第1抗体を用いることは、感度の向上や定量性の向上に対して非常に有利である。第1抗体の調製には一般的にモノクローナル抗体が用いられ、通常IgGが使用される。第1抗体としてIgGをそのまま用いると、IgGは通常2価結合性を有しているため、測定対象物である抗原と反応させた場合には、未反応のものを除くと、第1抗体と抗原の結合比が1 : 1または1 : 2の結合物が混在することになる。これは、IgG抗体1分子に含まれる結合部位には、常に抗原がすべて結合するわけではないためである。結合比が混在した結合物が第2の部位を通過すると、未反応のものに加えて、1 : 1の結合物も捕捉されることになり、感度や定量性を低下させる要因となる。これに対し、本発明では、1価結合性のF (a b') フラグメント又はIgGを還元して得られる半分子のIgGを使用しているため、未反応のものを除くと、第1抗体と抗原の結合比が1 : 1の結合物しか存在しないことになり、感度や定量性を向上させることが可能となる。

40

【0024】

第1抗体は、第1の部位に予め保持させてもよい。また、第1の部位の隣接部に抗体保持部を設けて、そこに保持させてもよい。この抗体保持部は、例えば、第1の部位等と同様の形状、大きさ等とすることができる。この抗体保持部は、試料溶液を添加する試料添加部とすること、また、一時的に試料溶液を保持することもでき、第1の部位へ試料溶液

50

及び／又は第1抗体を導入する機能を有する。

【0025】

第1抗体の標識物は、酵素、色素、酸化還元物質、着色粒子、磁性粒子、蛍光物質、発光物質、フェロセン等の一般的な免疫測定に用いられているものが使用可能であり、必要な測定感度等に応じて適宜選択できる。酵素を使用する場合は、マトリックスの影響を受けにくい酵素、生体内又は試料にほとんど存在しない酵素を使用するのが好ましい。例えば、パーオキシダーゼ、オキシダーゼ系酵素等が好ましいものとして挙げられる。オキシダーゼ系酵素としては、グルコースオキシダーゼ、ピラノースオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ等を用いることが出来る。その他の酵素としては、デヒドロゲナーゼ系酵素が挙げられるが、生体内に存在しないもので安価に入手可能なものはほとんどない。生体由来の酵素と同じ作用を有する微生物或いは細菌等由来の酵素を用いる場合は、第1の部位又は第2の部位に当該酵素に対する抗体等を含ませて、ヒト由来の酵素を除去するよう構成すれば利用可能である。また、酵素の基質又は補酵素に対する特異性を利用することも可能である。例えば、*Leuconostoc mesenteroides*由来のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼで補酵素にNADを用いた場合では、ヒト由来の本酵素はNADP依存性なのでヒト由来の酵素は作用しないため、試料中に存在しても問題はない。

10

【0026】

第1抗体は、通常、試料溶液に含まれる抗原に対して過剰量用いることが好ましいが、測定範囲を予め設定して、それに適した量を用いることもできる。例えば、予め測定可能な抗原濃度又はその範囲を設定しておき、モル比でその設定した濃度又は範囲上限の1~1000倍量を使用することが適当である。試料溶液と第1抗体を混合して反応させる場合の条件は、特に限定されるものではなく、測定しようとする試料溶液、第1抗体の種類等により適宜設定することができる。温度は、これらの物質の活性に影響を与えない条件、例えば、20~40℃程度が好ましい。時間は、適宜装置の形態により設定することができるが、30秒間~10分間程度であれば良い。

20

【0027】

第2の部位は、抗原と結合していない第1抗体と第2抗体とを反応させる部位である。この第2の部位では、第1の部位から移動してきた溶液と第2抗体とが混合され反応し、そのまま第3の部位へ移動する。第2抗体は、ビオチン又はアビジンを結合させた抗体で、第1抗体に対する抗イデオタイプ抗体でかつ抗原と第1抗体との結合物には結合できない種類の抗イデオタイプ抗体であり、第2の部位又はその隣接部に含まれている。

30

【0028】

抗体へビオチンを結合させるには、公知の方法が用いられる。例えば抗体のアミノ基を利用する場合は、N-ヒドロキシスクシンイミド-ビオチンを使用すればよい。また、IgGを還元、又はペプシン消化してF(a b')フラグメント化し、さらに還元して得られるSH基を利用する場合には、マレイミド-ビオチンを使用すればよい。この場合、アビジンとの反応性を高くするために、スパーサーを導入したビオチン化試薬を使用するのが好ましい。また、最終結合物に混入する未反応のビオチン化試薬又は未標識の抗体は、精製によって完全に除去しておくことが好ましい。

【0029】

抗体へアビジンを結合させるには、公知の方法が用いられる。例えばIgGを還元、又はペプシン消化してF(a b')フラグメント化し、さらに還元して得られるSH基と、マレイミド基を導入したアビジンを反応させればよい。この場合のアビジンへのマレイミド基の導入は、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル等の市販の導入試薬が利用できる。また、最終結合物に混入する未反応のアビジン化試薬又は未標識の抗体は、精製によって完全に除去しておくことが好ましい。

40

【0030】

ここで用いる抗イデオタイプ抗体とは、第1抗体の抗体部分が有する抗原結合部位の固有の構造を認識するモノクローナル抗体のことである。抗イデオタイプ抗体は、抗原

50

とそれに対する抗体の結合を阻害できるタイプと阻害できないタイプが存在することが知られている。本発明に使用できる抗イデオタイプ抗体は、前者であり、すなわち抗原と第1抗体の結合物には結合できないタイプのものを指す。

【0031】

抗イデオタイプ抗体は、通常の方法に従って容易に作製することができる。例えば、マウス由来のモノクローナル抗体の抗イデオタイプ抗体を作る場合、抗原となるモノクローナル抗体をKLH複合体としてマウスに投与して、あとは通常モノクローナル抗体の作製方法に従って製造することができる。また、目的とするタイプの抗イデオタイプ抗体を産生するハイブリドーマは、ELISA等によるスクリーニングによって容易に得ることができる。従って、本発明に使用できる抗イデオタイプ抗体は、通常モノクローナル抗体と同様に、容易かつ大量に作製することができる。

10

【0032】

本発明において、第2の部位に用いる第2抗体の量は、未反応の第1抗体をほぼ完全に捕捉する必要があるため、第1抗体の量に対して過剰量必要で、具体的には、モル換算で10倍以上の量を使用するのが好ましい。ここで、抗イデオタイプ抗体の代わりに抗原を使用することもできるが、この場合、実用的な見地から、安定性の良い抗原、低コストで大量に用意できる抗原に限られ、測定対象物が限定されてしまうので、本発明装置においては、抗原は使用しない。

【0033】

第2の部位での反応条件は、特に限定されるものではなく、適宜設定することができる。温度は、これらの物質の活性に影響を与えない条件、例えば、20～40℃程度が好ましい。時間は、適宜装置の形態により設定することができるが、30秒間～10分間程度であれば良い。

20

【0034】

第3の部位は、第2抗体がビオチン結合抗体の場合はアビジンが、第2抗体がアビジン結合抗体の場合はビオチンが第4の部位に移動できないように固定手段に固定され、第2抗体を前記固定されたアビジン又はビオチンで補足する部位である。この第3の部位では、ビオチンとアビジンとの結合性により、未反応の第1抗体と結合した第2抗体及び未反応の第2抗体は固定手段に捕捉されて第3の部位から移動することが出来ないが、一方、抗原と第1抗体との結合物は、アビジン又はビオチンを含まないため、固定手段に捕捉されることなく第4の部位へ移動することになる。尚、本発明に用いるアビジンは、由来は問わず用いることが出来る。例えば卵白由来のアビジン、放線菌由来のストレプトアビジン等を用いることが出来る。

30

【0035】

固定手段は、アビジン又はビオチンを固定し得るものであり、アビジン-ビオチンの反応に影響を与えないものであれば特に限定されるものではなく、測定対象物及び標識抗体の種類、抗イデオタイプ抗体の種類等によって適宜調整することができる。その形状は、フィルター状、織物状、微粒子状、繊維状等の形状の担体が挙げられる。材質としては、ガラス、濾紙、ナイロン、ポリスチレン等が挙げられる。フィルター状、織物状、繊維状の担体としては、ガラス繊維膜、多孔性メンブレン、濾紙、ナイロン膜等の多孔質体が好ましい。微粒子状の担体としては、ガラスビーズ、ポリスチレン等のポリマービーズ、アガロース、キトサン等の多孔質担体が好ましい。アビジン又はビオチンの固定の方法は、物理的吸着、共有結合、イオン結合、架橋、静電相互作用等公知の方法のいずれかを利用することができる。なお、固定の方法は、アビジン-ビオチンの反応に影響を与えないものであることが好ましい。

40

【0036】

本発明のように、固定手段に固定化する物質にアビジン又はビオチンを用いることは、反応時間の短縮に有用である。この反応時間短縮効果は、固定手段が微粒子で緩衝液等の溶液に分散状態で存在しているとき、特に著しいものとなる。反応様式上、このような固定手段に直接ビオチン又はアビジン未標識の第2抗体を結合させて未反応の第1抗体を補

50

足することも可能であったが、この場合、10分間～1時間程度反応させる必要があった。これに対して、本発明のようにアビジン又はビオチンを利用すると、未反応の第1抗体と結合した第2抗体及び未反応の第2抗体を30秒間～5分間、最適条件では30秒間～1分間で完全に捕捉できることが明らかになった。このことは、本発明における測定時間の短縮に多大な貢献をもたらす要因となっている。

【0037】

第4の部位は、抗原と結合した第1抗体の標識物を検出する部位で、標識物の検出には、標識物に応じて公知の検出方法を用いることができる。標識物を検出するための試薬は、第4の部位に含ませることができる。これらの試薬類は、第4の部位に全て含ませることも可能であるし、一部の試薬を第3の部位、第2の部位又は第1の部位若しくは更に別の部位に含ませておくことも可能である。また、第4の部位の隣接部に基質保持部を設け、ここに含ませることもできる。尚、基質保持部は、第4の部位とは、直列に又は付加的に、流路を介して又は介さないで、連結されていて、第1の部位等と同様の形状、大きさ等とすることができる。標識物の検出は、例えば反射率計、分光光度計、蛍光検出器等を用いて実施される。

10

【0038】

標識物を検出するための試薬類は、標識物に従って適宜選択される。標識物が酵素の場合は、発色基質、蛍光基質、発光基質、有機酸又は無機酸、電極と測定対象物との間で電子を授受し得る電子移動媒体として機能し得る電子伝導メディエータ等の1種又は2種以上の組み合わせが挙げられる。例えば、デヒドロゲナーゼ系の酵素の場合は、NAD又はNADP、酵素基質、ジアホラーゼ、及び発色基質の組み合わせが使用できる。パーオキシダーゼの場合は、有機酸又は無機酸、及び発色基質の組み合わせが使用できる。さらにオキシダーゼ系の酵素の場合は、酵素基質、発色基質、及びパーオキシダーゼの組み合わせが使用できる。

20

【0039】

発色基質、蛍光基質、発光基質としては、1, 2-フェニレンジアミン(OPD)、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン(TMBZ)、2, 2'-アジノビス-3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸(ABTS)、3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸(HPPA)、チラミン(Tyramin)、ルミノール、ルシフェリン等が挙げられる。

30

【0040】

有機酸又は無機酸としては、過酸化水素、蟻酸、酢酸等が挙げられる。或いは、装置内で発生させる試薬類も使用できる。例えば、過酸化水素を装置内で生成させるための試薬類として、グルコースとグルコースオキシダーゼが使用できる。使用例としては、保持部を2カ所用意しておき、測定開始後、両者を混合させることにより達成できる。また、外の部位に保持させておくことも可能である。

【0041】

電子伝達メディエータとしては、例えば、フェロセン、フェリシアン化アルカリ金属(フェリシアン化カリウム、フェリシアン化リチウム、フェリシアン化ナトリウム等)又はこれらのアルキル置換体(メチル、エチル、プロピル置換体等)、メチレンブルー、フェナジンメトサルフェート、p-ベンゾキノン、2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール、 β -ナフトキノン-4-スルホン酸カリウム、フェナジンエトサルフェート、ビオローゲン、ビタミンK等の酸化還元性の化合物の1種又は2種以上の組み合わせが挙げられる。なかでも、フェロセン、フェリシアン化カリウム等が好ましい。

40

【0042】

なお、これらの試薬等を保持させる方法としては、試薬自体をそのまま、自身の機能を阻害しない溶媒等に溶解又は懸濁等させ、塗布、乾燥する方法、或いは担体(例えば上述した固定手段)等に混合又は分散させて固定する方法等、当該分野で公知の方法のいずれかを利用することができる。

【0043】

50

本発明における測定対象物とは、一般的な臨床検査等における検査対象物を指し、具体的には、血液、尿、唾液、分泌液等に含まれる各種成分や、組織、便等の固形物からの抽出液等に含まれる各種成分等のことである。本発明では、測定対象物に対して1種類の抗体しか必要としないため、複数のモノクローナル抗体が結合できるような分子量の大きい物質だけでなく、1つのモノクローナル抗体しか結合できない低分子物質（ハプテン）も測定対象物となりうる。

【0044】

以上、本発明の免疫測定装置について説明した。図8には、本発明の測定原理を簡潔に図示した。図中の上段（ア）は、装置5全体を斜視図で示したものである。図中の矢印Xは、試料の流れる方向を示している。また、図中の下段（イ）は、装置中で起こる反応の様子を経時的に示したものである。すなわち、 $T = t_0$ では、抗原Aと第1抗体Bとが、第1の部位1で混合された状態を示している。適当な時間が経過し、 $T = t_1$ になると、試料が第2の部位2を経て第3の部位3、第4の部位4を通過する。このとき、抗原Aと反応しなかった第1抗体Bは、第2のビオチン結合抗体Cに結合され、さらに第3の部位のアビジンに結合され、第3の部位3から第4の部位4に移動することができない。一方、抗原Aと反応した第1抗体Bは、第2の部位2、第3の部位3を通過し、第4の部位4に至る。こうして、第4の部位4では、抗原Aと反応した第1抗体Bのみが検出される。

【0045】

一方、本発明の免疫測定方法については、本発明の免疫測定装置を使用して容易に実施することができるので、更なる説明は割愛する。以下に、本発明装置の一例として、試験片とも称されるテストストリップ状の装置、バイオチップ状の装置について詳細に説明する。

【0046】

まず、図1及び図2にテストストリップ状の装置を例示する。装置5は、第1の部位1、第2の部位2、第3の部位3及び第4の部位4から構成されている。これらの各部位は、多様な材質、形態から構成することが可能であり、中でも、ガラス繊維膜、多孔性メンブレン、濾紙、ナイロン膜等の多孔質担体で構成することが好ましい。第1の部位に提供された試料溶液又はその一部は、順次展開或いは送液され、第2の部位を通り、さらに第3の部位を通過して第4の部位に到達する。第3の部位の固定手段としては、フィルター状、織物状、繊維状の多孔質体を使用するのが好ましい。固定手段として微粒子状のものを使用する場合は、粒子の大きさは第3の部位を構成する多孔質担体のポアサイズより大きな粒子を使用することが好ましい。第1の部位の上流部に試料添加部を設置する場合には、例えば、血球分離膜、イオン交換膜等が利用できる。ここでは、一つの多孔質担体上に各部位を構成することも可能であるが、各部位ごとに最適な担体を選んで使用することもできる。各部位ごとに材質を変える場合は、各部位が互いに接触するように配置して、溶液の流れを阻害しないようにする必要がある。各部位の大きさは特に限定されるものではなく、この目的を実現するために十分な大きさを有していることが必要であるが、これらの物質の種類、量、反応時間などに応じて適宜設定することができる。各部位の担体の組み合わせとしては、第1の部位をガラス繊維膜、第2の部位及び第3の部位をニトロセルロース膜、第4の部位を濾紙とするような実施態様が例示できる。また、各部位は、プラスチック製シート等からなる支持体上に配置するのが好ましく、そのような装置例が図2である。図2では、支持体6の上に、第1の部位1、第2の部位2、第3の部位3、および第4の部位4が配置されており、これらが装置5を構成している。

【0047】

次に、図3および図4にバイオチップ状の装置を例示する。第1の部位1、第2の部位2、第3の部位3及び第4の部位4は、それぞれの部位が微小な空間で構成され、それぞれ、流路を介して、又は流路を介さないで直接、直列に連結されている。図3～5においては、微小流路31で繋がった構成としている。第1の部位に提供された試料溶液又はその一部は、順次送液され、第2の部位を通り、さらに第3の部位を通過して第4の部位に到達する。次の部位へ移る反応液の量を調節又は計量するために、第1の部位、第2の部位

、第3の部位および第4の部位の各間には、容積 $0.5 \sim 1.5 \mu\text{L}$ の計量部を設けることもできる。固定手段が微粒子41である場合には、第3の部位3と第4の部位4とが固定手段を通過させないチャンネル部32で分離されている。ここで、第2の部位と第3の部位との間にもまた、チャンネル部32と同様の構成物を設けることが好ましい。第1の部位、第2の部位及び第4の部位の隣接部には、反応に必要な試薬等を保持する部位（抗体保持部42、基質保持部43）を設置することもできる。この各部位と抗体保持部及び／又は基質保持部は、直列に又は付加的に、流路を介して又は介さないで、連結されている。基質保持部を設ける場合は、第1の部位等と同様の形状、大きさ等とすることができる。これにより、試薬類を、基質保持部に予め又はその使用直前に、保持させることができる。各部位を連結する流路の形状、大きさ等は特に限定されるものでなく、例えば、断面積が $0.01 \mu\text{m}^2 \sim 100 \text{mm}^2$ 程度、長さが $1 \mu\text{m} \sim 100 \text{mm}$ 程度のものが挙げられる。

【0048】

第1の部位は、他の部位とは別個の空間として規定され、その大きさは $10^{-2} \sim 10^3 \text{mm}^3$ 程度が好ましい。また、形状は混合目的に適切なものであれば特に限定されるものではない。平面及び断面形状ともに、例えば、四角形、台形等の多角形及びこれらの角部分が丸みを帯びた形状、円形又は左右非対称の不均一形等どのような形状であってもよい。第1の部位又はその隣接部には、外部から試料溶液を注入する注入口33が形成されている。第1の部位には、予め、第1抗体を保持させてもよい。また、第1の部位の隣接部に抗体保持部を設置する場合、その抗体保持部は、上述した試料溶液を注入する注入口の代わりに又は注入口に加えて形成されていてもよい。この抗体保持部は、例えば、第1の部位等と同様の形状、大きさ等とすることができる。

【0049】

第2の部位は、他の部位とは別個の空間として規定され、その大きさは $10^{-2} \sim 10^3 \text{mm}^3$ 程度が好ましい。また、その形状は、第1の部位と同様に、種々の形態に設定することができる。また、第2の部位に予め、第2抗体を保持させても良い。或いは、第2の部位の隣接部に抗体保持部を設置し、第2抗体を保持させてもよい。この抗体保持部は、例えば、第2の部位等と同様の形状、大きさ等とすることができる。

【0050】

第3の部位は、他の部位とは別個の空間として規定され、固定手段をその内部に含んでいる。したがって、第3の部位は、固定手段を保持するための十分な空間を有していることが必要であるが、固定手段の種類、量等に応じて適宜設定することができる。例えば、 $10^{-2} \sim 10^3 \text{mm}^3$ 程度が好ましい。また、その形状は、第1の部位又は第2の部位と同様に、種々の形態に設定することができる。

【0051】

固定手段は、第3の部位内に収納され、微粒子状のものを使用するのが好ましく、その直径は、 $10 \mu\text{m} \sim 1 \text{mm}$ 程度のものが好ましい。

【0052】

チャンネル部は、第3の部位内に存在する固定手段の径よりも小さい径を有するのが好ましい。ここで、「径」とは、固定手段及び／又はチャンネル部の形状によって、幅、高さ、長さ等とすることができるが、固定手段の「径」においては固定手段1単位における最大の長さ（幅）、チャンネル部の「径」においてはチャンネル部の断面における最小の長さ（幅）であることが適当である。つまり、チャンネル部は、第3の部位に存在する固定手段を、第3の部位内にもみ止めるために、第3の部位の出口（好ましくは入口にも）に、固定手段を通過させない機能又は形状を与えている。なお、チャンネル部が流路自体である場合は、例えば、固定手段の径よりも細い径の流路であってもよいし、流路の一部において、1以上の凸部を形成して、その径を狭める部分を含むものでもよい。

【0053】

第4の部位は、他の部位とは別個の空間として規定され、その大きさ及び形状は、検出方法（手法）、試料溶液の種類及び量等に応じて適宜設定することができる。具体的には

、 $10^{-2} \sim 10^3 \text{ mm}^3$ 程度の大きさで、種々の形状に設定することができる。例えば、検出方法が光学的方法である場合には、第4の部位において、試料溶液、標識物又は基質から生成される生成物に光を照射し、その光を検出し得るように、所定長さの光路を確保することができる形状及び大きさであることが必要である。また、電気化学的方法である場合には、図5に示すように、第4の部位において、試料溶液を含む溶液の電荷を検出し得るように、導電性材料による一対の電極51がこの溶液に接触するように形成されていることが必要である。

【0054】

ここで、前記一対の電極は、通常、電極として機能することができる材料、大きさ及び形状であれば特に限定されることはなく、どのようなものでも用いることができる。例えば、グラファイト、カーボン、カーボンファブリック等、金、白金、銀、銅、アルミニウム等の金属又は合金、 SnO_2 、 In_2O_3 、 WO_3 、 TiO_2 等導電性酸化物等の単層又は2以上の積層構造が挙げられる。この電極は、導電材料片をバイオチップに貼り付けるか、一部を埋設するなどして形成してもよいし、導電剤ペーストを用いたスクリーン印刷法等の印刷法を用いて形成してもよい。

10

【0055】

このように、電気化学的手法を採用することにより、従来の光学的検出装置のような、大掛かりで高価かつ大型の装置を用いることなく、電流又は電圧等の検出という簡便な方法によって、被検物質の分析を行うことができる。従って、分析にかかる費用を低減させることができるとともに、より小型のバイオチップ及びより小型で安価な分析装置の使用を実現することができる。

20

【0056】

上記バイオチップは、上述した種々の名称で呼ばれている従来のチップと同様の材料で形成することができる。例えば、PET（ポリエチレンテレフタレート）、PDMS（ポリジメチルシロキサン）、PMMA（ポリメチルメタクリレート）、PC（ポリカーボネイト）、PP（ポリプロピレン）、PS（ポリスチレン）、PVC（ポリ塩化ビニル）、ポリエチレン、ポリシロキサン、アリルエステル樹脂、シクロオレフィンポリマーなどの有機化合物、或いは、ゼオノア、シリコン、石英、ガラス、セラミック等の無機化合物等が挙げられる。

30

【0057】

このバイオチップは、例えば、一方又は双方に凹部による種々の形状のパターンを有する第1基板と第2基板とを、例えば、溶着、接着剤、超音波処理等によって、貼り合わせることによって簡便に製造することができる。具体的には、所望の第1～第4の部位、保持部、流路等に対応する形状を有する金型を準備する。この金型は、機械的加工により形成することができる。次に、この金型に、樹脂をモールド等して各部位の形状が転写された基板を得る。最後に、この基板を、パターン同士が対向するように、2枚張り合わせる。なお、第1～第4の部位、保持部、流路等に対応するパターンを有する基板を一方のみとし、他方を平板基板としてもよい。また、金型を用いたモールドに代えて、射出成型法又はインプリント法等を利用してよい。さらに、平板基板の一方又は双方に、フォトリソグラフィ工程、機械的加工等を直接施して、第1～第4の部位、保持部、流路等に対応するパターンが転写された基板を得てもよい。なお、本発明のバイオチップは、その取り扱い（例えば、試料等の導入、混合、攪拌、試料等の移行、検出など）を手動で行っても、機械的に行ってもよいし、一部のみ機械的に行ってもよい。例えば、攪拌及び混合、試料等の移行は、ポンプを利用する方法、振動又は遠心力を利用する方法を用いることができる。

40

【実施例】

【0058】

以下に、本発明の実施例を挙げて、本発明について更に詳細に説明する。しかしながら、本発明は、これら実施例に限定されるものではない。

【0059】

50

1. ビオチン標識抗イデオタイプ抗体の作製

(1) 免疫源の作製

市販の抗ヒトCRPマウスモノクローナル抗体（オリエンタル酵母製）5mgとKLH（メルク製）4mgを含む0.1Mリン酸緩衝液（pH6.7）2mLにグルタルアルデヒド（70%）3 μ L添加して、室温で1時間反応させた。反応後、PBS緩衝液で透析して免疫源とした。

【0060】

(2) 免疫化

上記免疫原の0.5mg/mL溶液1mLと完全フロイントアジュバント1mLとを混合して乳化したものを8週令のBALB/cマウスに200 μ L腹腔内投与した。その後2週間おきに3回、上記免疫原-不完全フロイントアジュバント等量混合乳化液200 μ Lを腹腔内投与した。更に、3回目の投与から2週間後に、上記0.5mg/mLの免疫原100 μ Lを静脈注射した。

10

【0061】

(3) 脾細胞の細胞融合

3日後、上記マウスから脾臓を摘出し、脾細胞をDMEM培地に懸濁し、洗浄を行った。一方、マウスミエローマ細胞株P3X63Ag8（大日本製薬製）を、細胞融合に合わせて対数増殖期になるように培養し、遠心分離により集めた。細胞融合はPEG法（PEG4000）を用いて実施した。

【0062】

20

(4) ハイブリドーマの作製とスクリーニング

ハイブリドーマは、10%FCS入りDMEM培地とHAT培地により培養し、以下の方法によりスクリーニングした。ハイブリドーマ培養上清の一次スクリーニングは、固相抗原として抗ヒトCRPマウスモノクローナル抗体からペプシン消化して得た精製F(ab')₂フラグメント、二次抗体として市販のHRP標識ヤギ抗マウスIgG(Fc)抗体（ICN社製）を用いたサンドイッチELISA法により実施した。さらに、二次スクリーニングとして上記固相抗原にCRPをあらかじめ反応させて同様に操作することにより、CRPにより結合阻害を起こすタイプかどうか判定した。陽性ウェルのクローニングとスクリーニングの結果、抗ヒトCRPモノクローナル抗体を特異的に認識し、さらにCRPにより結合阻害を起こす抗体を産生するハイブリドーマとして、13Dと14Aの2クローンを得た。

30

【0063】

(5) 抗体の調製

上記で得られたハイブリドーマ細胞株のうち、13Dを拡大培養して抗イデオタイプ抗体の採取を行った。培養上清の精製は、プロテインAカラム（アマシヤム バイオサイエンス製）により実施した。

【0064】

(6) ビオチン標識体の作製

NHS-Biotin（Pierce社製）を用い、プロトコールに従って（5）で得た抗体のビオチン標識を実施した。なお、未反応のビオチン化試薬はゲル濾過により除去した。

40

【0065】

2. HRP標識抗ヒトCRP抗体の作製

(1) ペプシン消化

0.1M酢酸緩衝液（pH4.0）1mLに抗ヒトCRPマウスモノクローナル抗体5mgとペプシン（シグマ アルドリッチ製）0.3mgを混合し、37℃で24時間反応させた。反応後、ゲル濾過にて精製し、F(ab')₂フラグメントを1.8mg得た。なお、抗ヒトCRPマウスモノクローナル抗体は、前記同様の市販品を使用した。

【0066】

(2) 還元

F(ab')₂フラグメント溶液は、限外濾過膜により5mMEDTAを含む0.1M

50

リン酸緩衝液 (pH 6.5) に置換した。この抗体液に 0.1 M システアミン溶液を加えて 37°C で 2 時間反応させた。反応後、ゲル濾過にて精製し、F (a b') フラグメントを 1.0 mg 得た。

【0067】

(3) HRP のマレイミド化

西洋ワサビパーオキシダーゼ (HRP、ロシュ・ダイアグノスティックス製) 5 mg を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 750 μ L に溶解した。DMF 120 μ L に 4- (N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (ジーベンケミカル東京) 2 mg を溶解し、HRP 溶液に 75 μ L 加えて、30°C で 1 時間反応させた。反応後、ゲル濾過にて精製し、マレイミド化 HRP を 2.6 mg 10 得た。

【0068】

(4) コンジュゲートの調製

F (a b') フラグメント 1.0 mg とマレイミド化 HRP 1.0 mg を混合し、冷蔵で 24 時間反応させた。反応後、ゲル濾過にて精製し濃縮操作後、1.2 mg/mL の HRP 標識抗ヒト CRP 抗体液を得た。

【0069】

実施例 1 テストストリップ状の CRP 測定装置の作製

(1) 標識エリア用濾紙 (第 1 の部位) の調製

PBS 緩衝液 10 mL で BSA 10 mg、グルコース 10 mg を溶解させた。次に、この溶液で実施例 2 で作製した HRP 標識抗ヒト CRP 抗体を 5000 倍希釈した。さらにこの溶液に濾紙 (ワットマンジャパン製) を含浸させて乾燥後、12 mm \times 5 mm に裁断した。 20

【0070】

(2) ビオチン標識抗体含有濾紙 (第 2 の部位) の調製

PBS 緩衝液 10 mL に BSA 10 mg、シヨ糖 10 mg を溶解させた。次に、この溶液を用いて実施例 1 で作製したビオチン標識抗イディオタイプ抗体の 20 μ g/mL 溶液を調製した。さらにこの溶液に濾紙 (ワットマンジャパン製) を含浸させて乾燥後、10 mm \times 5 mm に裁断した。 30

【0071】

(3) 捕捉エリア用メンブレン (第 3 の部位) の調製

PBS 緩衝液でアビジン 1mg/mL 溶液を調製した。次に、この溶液に 15 mm \times 150 mm に裁断したハイフローメンブレン (ミリポア製) を含浸させて乾燥させた。さらに、3 mg/mL カゼイン溶液に入れて 30 分放置後、取り出して乾燥し、15 mm \times 5 mm に裁断した。

【0072】

(4) 検出エリア用濾紙 (第 4 の部位) の調製

TMBZ 5 mg、ピラノースオキシダーゼ 30 単位を PBS 緩衝液 1 mL に溶解した。この溶液に濾紙 (ワットマンジャパン製) を含浸させて乾燥後、7 mm \times 5 mm に裁断した。 40

【0073】

(5) 試験片の組み立て

支持体であるプラスチック板 (60 mm \times 5 mm) に上端から 25 mm 幅で両面粘着テープを貼った。次に、このプラスチック版の上端を 5 mm ほど空けて上記 (3) のメンブレンを貼り付けて固定した。次に、(3) のメンブレンの上端と 2 mm ほど重なり合うように (4) の濾紙を貼り付けて固定した。さらに、(3) のメンブレンの下端が 2 mm ほど重なり合うように (2) の濾紙を貼り付けて固定した。さらに、(2) の濾紙の下端が 2 mm ほど重なり合うように (1) の濾紙を貼り付けて固定した。

【0074】

試験例 1 テストストリップ状の装置を用いた CRP 定量測定

50

0、7.5、15、30、60、120 ng/mLのCRPを含有する溶液を検体として用いた。実施例3で作製した試験片の第1の部位に、検体30 μLを添加して反応を開始し、5分後に色差計により第4の部位の690 nmにおける反射率を測定した。得られた反射率とヒトCRPの濃度との関係を示す検量線を図6に示した。これによれば、低濃度から良好な検量線を示しており、CRPが定量可能であることが判明した。

【0075】

実施例2 バイオチップ状のCRP測定装置の作製

バイオチップの作製は、一方に凹部により、第1の部位、第2の部位、第3の部位および第4の部位を直列に配設し、第3の部位と第4の部位との間には、チャンネルを設けた形状のパターンを有する第1基板と第2基板とを貼り合わせるによって行った。第1の部位、第2の部位、第3の部位および第4の部位の各間には、容積0.5~1.5 μLの計量部を設けた。

10

【0076】

第1の部位は、50 mm² (平面積) × 1 mm (深さ) 程度の空間とした。第1抗体としては、実施例2で作製したHRP標識抗ヒトCRP抗体液0.05 mg/mL溶液を10 μL注入した。

【0077】

第2の部位は、50 mm² (平面積) × 1 mm (深さ) 程度の空間とした。第2抗体としては、実施例1で作製した抗イディオタイプ抗体液4.2 mg/dL溶液を5 μL注入した。

20

【0078】

第3の部位は、50 mm² (平面積) × 1 mm (深さ) 程度の空間とした。その中に、アビジン固定化セファロースゲル (アビジン結合量10mg/mLゲル) を10 μL導入した。アビジン固定化セファロースゲルの調製は、NH₂活性化セファロース (アマシヤム バイオサイエンス製) を使用し、ゲルへのアビジンの固定化方法は供給元の推奨方法に従った。

【0079】

第4の部位は、光学的検出として吸光度を測定するために、長さ100 mm程度で、断面積が1 mm²程度の形状とした。発色試液としてSAT-Blue (同仁化学研究所製) を20 μL注入した。

30

【0080】

第3の部位と第4の部位との間には、固定手段を通過させないチャンネル部を設け、幅を100 μm程度、深さを200 μm程度に設定した。また、第1の部位、第2の部位、第3の部位および第4の部位は、微小流路で直列に繋げた。

【0081】

試験例2 実施例2のバイオチップ状の装置を用いたCRP定量測定

0、2.5、5、7.5、10 mg/dLのCRPを含有する溶液を検体として用いた。実施例2で作製したバイオチップの第1の部位に、検体1.5 μLを添加した。次に、溶液を、第1の部位、第2の部位、第3の部位と順次通過させた。部位間で行う溶液の計量は一般的に周知の手法を用いた。この際、送液には遠心力を用い、混合は遠心力により乱流を起こすことにより行った。最後に第4の部位で670 nmにおける吸光度の変化速度を測定した。得られた吸光度変化速度とヒトCRPの濃度との関係を示す検量線を図7に示した。これによれば、低濃度から良好な検量線を示しており、バイオチップでCRPが定量可能であることが判明した。

40

【0082】

実施例3 電気化学的検出方法を用いたバイオチップ状のCRP測定装置の作製

この実施例のバイオチップは、図5に示したように、第4の部位に一对のカーボンブラックによる電極25を形成し、さらに酸化還元性物質を充填した以外、実施例2のバイオチップと同様の構成とした。電極は、長さ10 mm程度、厚さ15 μm程度でカーボンペーストによって形成した。これらの電極はバイオチップを構成する下部基板の第4の部位

50

に対応する位置に配置した。下部基板上に上部基板を貼り合わせると、電極の一部はバイオチップ内側に位置し、かつ一部は露出するように設計された。また、第4の部位にはS A T-B l u eの代わりに、基質として、5 mMの過酸化水素と、3 mMのフェロセンを注入した。

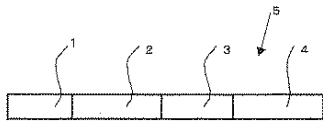
【0083】

試験例3 実施例3のバイオチップ状の装置を用いたCRP定量測定

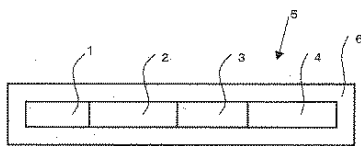
このバイオチップにCRPを含む検体1.5 μLを添加し、第1の部位、第2の部位、第3の部位と順次送液させた。第4の部位では、フェロセンを、標識物である酵素によってフェリシニウムイオン (Fc⁺) に変換し、さらにこれを電極上で還元するという酸化還元反応を行わせることにより、その際に生じる電流値を測定した。この電流値は、CRPと標識抗体との複合体の濃度に比例した値となり、CRPを定量的に測定することができた。

10

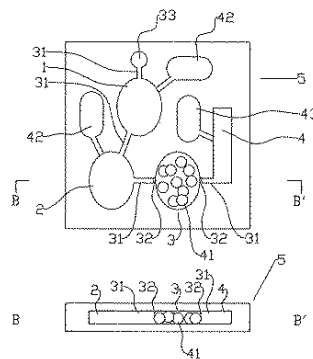
【図1】



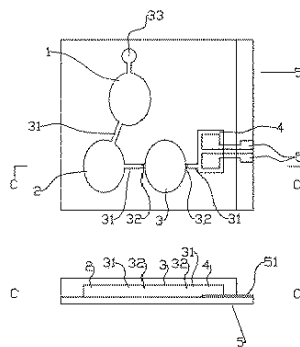
【図2】



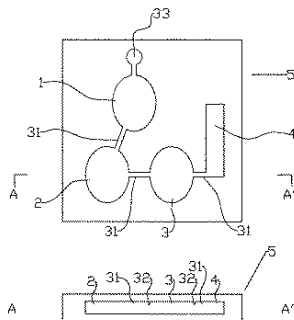
【図4】



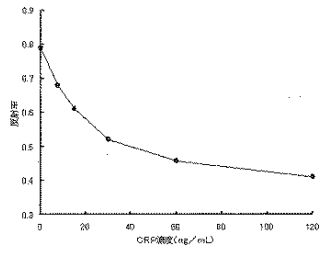
【図5】



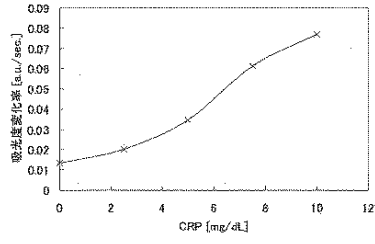
【図3】



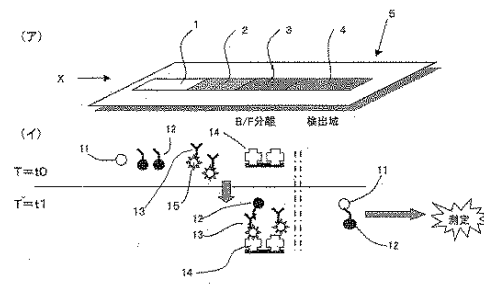
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2006/325539
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/543(2006.01)i, G01N33/53(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) G01N33/543, G01N33/53 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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 11-295314 A (Bayer Corp.), 29 October, 1999 (29.10.99), Par. No. [0021] & US 6210978 B1 & EP 940681 A2 & CA 2263139 A1	1-14
A	WO 2004/061452 A1 (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.), 22 July, 2004 (22.07.04), Page 9, lines 39 to 42 & JP 2005-507959 A	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 02 February, 2007 (02.02.07)		Date of mailing of the international search report 13 February, 2007 (13.02.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/325539

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 2002-040024 A (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.), 06 February, 2002 (06.02.02), & US 6838250 B2 & EP 1139101 A2 & EP 1139101 A9 & EP 1139101 B1 & DE 60116172 E & ES 2254330 T3 & DE 60116172 T2	1-14
A	JP 61-084561 A (Immunomedics, Inc.), 30 April, 1986 (30.04.86), & US 4699880 A & EP 176355 A	1-14
P,A	WO 2006/004039 A1 (Sanwa Kagaku Kenkyusho Co., Ltd.), 12 January, 2006 (12.01.06), (Family: none)	1-14

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 2 5 5 3 9									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, G01N33/53(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. G01N33/543, G01N33/53											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2007年</td> </tr> </table>				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
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)											
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 11-295314 A (バイエルコーポレーション) 1999. 10. 29, 【O O 2 1】 & US 6210978 B1 & EP 940681 A2 & CA 2263139 A1	1-14									
A	WO 2004/061452 A1 (株式会社医学生物学研究所) 2004. 07. 22, 第9頁第39-42行 & JP 2005-507959 A	1-14									
<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 02. 02. 2007		国際調査報告の発送日 13. 02. 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) 山村 祥子 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J 9217								

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 2 5 5 3 9

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 2002-040024 A (オーソークリニカル・ダイアグノスティックス・ インコーポレイテッド) 2002. 02. 06 & US 6838250 B2 & EP 1139101 A2 & EP 1139101 A9 & EP 1139101 B1 & DE 60116172 E & ES 2254330 T3 & DE 60116172 T2	1-14
A	JP 61-084561 A (イミュノメディックス、インコーポレイテッド) 1986. 04. 30 & US 4699880 A & EP 176355 A	1-14
PA	WO 2006/004039 A1 (三和化学研究所) 2006. 01. 12, (ファミリーなし)	1-14

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, 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, LV, 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

(72)発明者 竹廣 敦

愛知県名古屋市東区東外堀町35番地 株式会社三和化学研究所内

【要約の続き】

抗体である、免疫測定装置。

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	免疫测定装置和方法		
公开(公告)号	JPWO2007072922A1	公开(公告)日	2009-06-04
申请号	JP2007551157	申请日	2006-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	罗姆股份有限公司 株式会社三和化学研究所		
申请(专利权)人(译)	ROHM株式会社 株式会社三和化学研究所		
[标]发明人	林陽子 竹廣敦		
发明人	林 陽子 竹 廣 敦		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N37/00 G01N27/416		
CPC分类号	G01N33/558 C07K16/4208 C07K2317/54		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/53.U G01N33/543.545.F G01N37/00.101 G01N27/46.336.M		
优先权	2005369096 2005-12-22 JP		
其他公开文献	JP5097557B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种能够通过允许标记的抗体与样品中的抗原分析物特异性结合并检测结合产物的标记来测定抗原量的免疫测定装置，单个装置的内部具有四个区域，包括：(1)第一个样品中抗原与第一抗体反应的区域，第二抗体是能够特异性结合抗原的标记抗体；(2)第二区域，与抗体未结合的第一抗体与第二生物素或亲和素反应。(3)第三区域，其中根据第二抗体是生物素结合的抗体还是抗生物素蛋白结合的抗体，通过固定手段将抗生物素蛋白或生物素固定化，从而使其不能移动到第四区域。第二种抗体被固定的抗生物素蛋白或生物素捕获，(4)第四区域，在该区域中检测到与抗原结合的第一抗体的标记，其构建方式应使溶液可以移动依次穿过每个区域，第一抗体是标记抗体，使得抗体成分是F(ab₃)片段或还原的IgG，F(ab₃)片段或还原的IgG以预定比例与标记结合 第一抗体包括在第一区域或邻近区域中，并且第二抗体是生物素或抗生物素蛋白结合的抗体，具有针对第一抗体的抗独特型抗体并且不能结合抗原结合产物的类型。第一抗体，并且包括在第二区域或相邻区域中。

