

(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2007-240425

(P2007-240425A)

(43) 公開日 平成19年9月20日(2007.9.20)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 27/416	(2006.01)	GO 1 N 27/46	3 3 6 N	2 G O 5 8
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D	
GO 1 N 35/08	(2006.01)	GO 1 N 27/46	3 3 6 B	
GO 1 N 37/00	(2006.01)	GO 1 N 35/08	A	
		GO 1 N 37/00	1 O 1	
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 8 頁)				

(21) 出願番号 特願2006-65744 (P2006-65744)

(22) 出願日 平成18年3月10日 (2006.3.10)

(出願人による申告) 平成17年度地域コンソーシアム
研究開発事業に関する委託研究に基づく特許出願

(71) 出願人 504174135

国立大学法人九州工業大学
福岡県北九州市戸畑区仙水町1番1号

(71) 出願人 504157024

国立大学法人東北大学
宮城県仙台市青葉区片平2丁目1番1号

(74) 代理人 100077263

弁理士 前田 純博

(72) 発明者 竹中 繁織

福岡県北九州市戸畑区仙水町1-1九州工
業大学工学部物質工学科内

(72) 発明者 大塚 圭一

福岡県北九州市戸畑区仙水町1-1九州工
業大学工学部物質工学科内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 電気化学的抗原検出法とそのための装置並びに検出チップ

(57) 【要約】

【課題】 抗原、例えば、BSEの異常プリオンタンパク質である抗原を、その場（オンサイ
ド）診断で検出するための方法及びそのための小型化した装置を提供すること。【解決手段】 酵素免疫測定法により抗原を検出するに際し、酵素反応により分解されると
電気化学的に活性化される基質を用い、この活性化基質の電気化学的応答を測定すること
からなる抗原の電気化学的抗原検出法と、それに用いる装置である。この装置は、酵素免
疫測定法を実行するための手段と、酵素免疫測定法において形成された酵素反応産物の応
答を電気化学的に測定する手段、例えば、ボルタンメトリーやアンペロメトリーからなる
手段とを含むものである。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

酵素免疫測定法により抗原を検出するに際し、酵素反応により分解されると電気化学的に活性化される基質を用い、該活性化基質の電気化学的応答を測定することを特徴とする電気化学的抗原検出法。

【請求項 2】

抗原が異常プリオンタンパク質である請求項 1 記載の電気化学的抗原検出法。

【請求項 3】

活性化基質の電気化学的応答の測定が、ボルタンメトリー又はアンペロメトリーによるものである請求項 1 又は 2 記載の電気化学的抗原検出法。

10

【請求項 4】

酵素免疫測定法を実行するための手段と、酵素免疫測定法において形成された酵素反応産物の応答を電気化学的に測定する手段とからなる抗原検出装置。

【請求項 5】

酵素反応産物の応答を電気化学的に測定する手段が、ボルタンメトリー又はアンペロメトリーである請求項 4 記載の抗原検出装置。

【請求項 6】

電気化学的に抗原を検出するために用いられる検出チップであって、試料注入部、試薬注入部、洗浄液注入部、反応部、検出部及び廃液部と、これらを連結するマイクロ流路から構成された検出チップ。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、酵素免疫測定法 (Enzyme Immunoassay、EIA) を用いて抗原を電気化学的に検出する方法、特に、と畜牛の BSE 診断において重要な、異常プリオンタンパク質を電気化学的手法により迅速に検出する方法とそれに用いる装置に関する。

【背景技術】

30

【0002】

酵素免疫測定法 (EIA) は、抗原抗体反応において、酵素の発色を利用して抗原やその他の物質 (以下、本発明ではまとめて抗原という) を検出・測定する方法として広く知られている。EIA 法のうちプレート等に抗体を固定した方法を、ELISA 法 (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay、固相酵素免疫測定法) というが、ELISA 法は、例えば、近年問題となっている狂牛病又は牛海綿状脳症 (Bovine Spongiform Encephalopathy、以下 BSE という) の検査にも適用されている。この BSE は伝染性海綿状脳症 (Transmissible Spongiform Encephalopathy) という病気の一つであり、これに罹った牛の脳組織は、スポンジ状の変化を起こす。そして、結果として、起立不能等の症状を示す遅発性かつ悪性の中樞神経系の疾病を発症する。

40

【0003】

BSE を発症した牛の脳組織からは、プリオンと呼ばれるタンパク質の構造変化が観察される。BSE 発症牛において特異的にみられる、構造変化したプリオンタンパク質は異常プリオンタンパク質と呼ばれ、BSE 診断におけるマーカー (検査指標) として用いられている。従来の BSE 診断は、一般的に、蛍光を利用した ELISA 法により行われている (例えば、非特許文献 1、2 参照)。

【非特許文献 1】G. Safar, et. al., Nature Biotechnology, 20, 1147-1150 (2002)

【非特許文献 2】A. Warsinke, A. Benkert, F. W. Scheller, Fresenius J Anal Chem, 366, 622 (2000)

【0004】

50

国内の食肉加工の現場では、先ず、と畜牛は各自治体の動物検査場に集められ、そこでと畜牛から延髄組織を取り出し、それを懸濁したサンプルをELISA法によって検査している。そして、検査で陰性とされたと畜牛のみが、食肉用等として出荷される。このように、BSE検査は食用肉の安全性に関わるものであり、畜産農家にとって、牛の飼育管理は非常に重要になる。この観点から、と畜前の生きた牛の状態での定期的検査できる手法が望まれている。しかしながら、BSE検査は、と畜後にのみ可能であるのが現状である。これは検査標的である異常プリオンが、脳や脊髄などの中枢神経系に集まりやすいためであり、血液や尿といったサンプル中の異常プリオンの量が少ないためである。

【0005】

これらの背景から、と畜前診断を可能とすることを目的として、血液や尿から異常プリオンを濃縮するリンタングステン酸沈澱法（非特許文献3）や、異常プリオンを増幅するPMCA法（非特許文献4）等が研究されている。これらの手法が完成すれば、と畜前診断が可能となると期待される。

【非特許文献3】J. Castilla, et. al., Nature Medicine, 11, 982-985 (2005),

【非特許文献4】G. P. Saborio, et. al., Nature, 411, 810-813 (2001)

【0006】

一方、ELISA法を含むEIA法自体は臨床検査において一般化はしているが、専用の分析装置は高価・大型であるため、その場（オンサイド）診断を行う目的としては適していないという問題もある。以上のような状況から、例えば、と畜前診断のために畜産農家が導入可能な、小型・簡便で安価な測定装置としては、未だ開発されたものは存在しない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、通常のEIA法に電気化学的検出法を導入し、抗原、例えば、BSEの異常プリオンタンパク質である抗原を、その場（オンサイド）診断で検出するための簡易な方法、及びそのために小型化及び低価格化した装置を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、酵素免疫測定法により抗原、例えば、異常プリオンタンパク質を検出するに際し、酵素反応により分解されると電気化学的に活性化される基質を用い、この活性化基質の電気化学的応答を測定することを特徴とする電気化学的抗原検出法である。

【0009】

本発明はまた、前記検出方法を実施するための装置、即ち、酵素免疫測定法を実行するための手段と、酵素免疫測定法において形成された酵素反応産物の応答を電気化学的に測定する手段とからなる抗原検出装置も含むものである。この装置において、酵素反応産物の応答を電気化学的に測定する手段としては、ディファレンシャルパルスボルタンメトリー等のボルタンメトリー又はアンペロメトリーが好ましく採用される。

【0010】

更に、本発明は、前記検出方法あるいは装置の一部として用いられる、電気化学的に抗原を検出するために用いられる検出チップであって、試料注入部、試薬注入部、洗浄液注入部、反応部、検出部及び廃液部と、これらを連結するマイクロ流路から構成された検出チップをも含むものである。

【発明の効果】

【0011】

本発明は、測定手法に電気化学を採用することで装置の小型化を可能とし、臨床診断をその場（オンサイド）で行うことを可能にする。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

酵素免疫測定法（EIA）には、直接法、間接法、競合法、サンドイッチ法、その他の変法など多くの方法が知られている。厳密には、EIA法のうちプレート等に抗体を固定した方

法を、ELISA法（Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay、固相酵素免疫測定法）というが、ELISA法は、抗原を２種類の抗体で挟み込み定量するサンドイッチ法と同義に使われる場合もある。EIA法は、免疫反応即ち抗原抗体反応と、酵素基質反応の二つを組み合わせたものである。即ち、抗原抗体反応で捕捉された抗原を、酵素と発色基質による発色反応を利用して検出する。この際、二つの反応を関連付けるための手段として、抗体酵素複合体を用いるサンドイッチ法等の方法と、抗原酵素複合体を用いるいわゆる競合法がある。本発明において酵素免疫測定法とは、上記全ての方法を含むものである。

【 0 0 1 3 】

通常のEIA法においては、酵素と発色基質による発色反応を起こさせるためには、発色基質として蛍光等の発色物質が用いられる。例えば、アルカリホスファターゼを標識した抗体の場合、基質としてのp-ニトロフェニルリン酸を作用させると、p-ニトロフェノールが遊離し発色するので、405nmの波長を吸光度計で測定し発色量を求める。

10

【 0 0 1 4 】

これに対し、本発明は、上記酵素基質反応を、従来のEIA法における酵素と発色基質による発色反応を利用する方法に替えて、電気化学的变化を利用して測定することに特徴がある。即ち、本発明は、抗原、例えば、異常プリオンである抗原を、酵素免疫測定法により検出するに際し、酵素反応により分解されると電気化学的に活性化される基質を用い、この活性化された基質の電気化学的応答を測定して、間接的に抗原を検出・測定するものである。EIA法において、酵素反応により分解されると電気化学的に活性化される基質としては何でも良い。また、電気化学的応答を測定する方法についても特に制限はない。

20

【 0 0 1 5 】

本発明の手法を、いわゆるサンドイッチ法を例にして説明すると次の通りになる。（１）プリオン抗体を固定化する（プリオン抗体の固相化、チップ化）。用いる固相は一般的にELISA法で用いられているもので良く、例えば、ポリプロピレン、ポリスチレン、金薄膜が挙げられる。（２）固相化プリオン抗体によって検体中のプリオンを捕捉する。（３）酵素標識プリオン抗体、即ち、（１）のプリオン抗体とは認識部位が異なっている二次抗体をプリオンに結合させ、次いで、基質と酵素標識抗体中の酵素を反応させる。かかる反応の結果、基質は構造的に変化して酵素反応産物を形成し、その変化に際して電気シグナルが発生する。（４）酵素反応産物の応答を電気化学的に測定する。例えば、酵素反応産物の電気化学的応答を、電圧や電流の変化として検出する。電気化学的な測定法としては、特に限定されるものではないが、各種アンペロメトリーやボルタンメトリーが好適である。

30

【 0 0 1 6 】

アンペロメトリーは、電位ステップに対して電極に流れる電流を時間に対して測定、解析する手法であり、溶液中の電気化学活性種の定量分析に、広く用いられている方法である。ボルタンメトリーは、電極電位を変化させた時の応答電流を測定する手法として、広く用いられている。電極電位を直線的に変化させるサイクリックボルタンメトリーや、パルスにより変化させるパルスボルタンメトリーがある。得られる応答電流値は、溶液中の電気化学活性種の濃度に依存する。本発明においては、このような公知の電気化学的方法・手段を用いて、溶液中に生成した活性化基質の電気化学的応答を測定し、元の抗原の定性あるいは定量分析を行うものである。

40

【 0 0 1 7 】

本発明のEIA法における酵素としては、特に限定されるものではないが、例えば、アルカリホスファターゼ、西洋わさびペルオキシダーゼが好適である。本発明で用いられる基質も特に限定されるものではないが、例えば、アルカリホスファターゼ用基質としては、p-アミノフェニルリン酸やp-アミノナフチルリン酸が好ましく、西洋わさびペルオキシダーゼ用基質としては、o-フェニレンジアミンが好ましい。これら化合物は、酵素との反応で、電気化学測定に好ましい構造の酵素反応産物に変化する。

【 0 0 1 8 】

本発明の上記検出方法においては、もう一つの本発明である、酵素免疫測定法を実行する

50

ための手段と、酵素免疫測定法において形成された酵素反応産物の応答を電気化学的に測定する手段とからなる抗原検出装置が用いられる。酵素免疫測定法を実行するための手段としては、特に限定されるものではなく、例えば、ELISA法を実行するための器具やキットの組み合わせが挙げられる。酵素反応産物の応答を電気化学的に測定する手段も、特に限定されるものではないが、好ましいのは、ディファレンシャルパルスボルタンメトリー等のパルスボルタンメトリー又はアンペロメトリーである。例えば、市販のボルタンメトリー装置やアンペロメトリーの装置を用いることができる。

【0019】

前記本発明の検出方法又は検出装置において、酵素免疫測定と酵素反応産物の応答の測定のために使用する器具として、本発明のもう一つの発明である検出チップ、即ち、試料注入部、試薬注入部、洗浄液注入部、反応部、検出部及び廃液部と、これらを連結するマイクロ流路から構成された検出チップを用いるのが好ましい。

10

【0020】

本発明の検出チップは、一つの、例えば、名刺大のプラスチックの板に、それぞれが小さな溝あるいは凹部からなる試料注入部、試薬注入部、洗浄液注入部、反応部、検出部及び廃液部と、これらを連結するマイクロ流路を形成したものである。凹部の底は、抗体の固定化や電気化学的測定を考慮して、例えば、金の薄膜を付与するのが好ましい。試料注入部はサンプルを注入する部分であり、試薬注入部は抗体や化合物溶液を注入する部分であり、洗浄液注入部は洗浄バッファー等を注入する部分である。反応部はサンプル中の抗原を捕捉し、抗原-抗体反応、酵素反応を行う部分である。次いで反応液は検出部へ運ばれ、ここで電気化学シグナルが検出される。最終的に、反応液等は廃液部に流入し貯められる。以下、実施例により本発明を具体的に説明する。

20

【実施例1】

【0021】

[プリオンモデルタンパク質を用いた検討とその検出感度]

プリオンモデルタンパク質として、マウスプリオンの121番目から231番目までのアミノ酸が連結したポリペプチドを、大腸菌から組み換えタンパク質として調製し、これをモデルタンパク質とした(以下PrP121-231と略記する、M. R. Scott, et. al., Protein Science, 1, 986-997 (1992)参照)。このPrP121-231を、10 µg/ml炭酸バッファー(pH

30

9.0)溶液として調製し、この溶液を96穴プレートの各ウェルに100 µlずつ添加して、37で終夜インキュベートした。

【0022】

その後、50mM Trisバッファー(pH7.4)300 µlで三回洗浄した。プリオン抗体(マウスIgG1)を20mM Trisバッファー(pH 7.4)溶液で0.2 ng/ml、1 ng/ml、20 ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml、1 µg/mlの濃度にそれぞれ調製し、この溶液を、洗浄後の各ウェルに100 µlずつ添加して37で30分間インキュベートした。その後、50 mM Trisバッファー(0.05% Tween-20を含む、pH 7.4)300 µlで三回洗浄した。抗マウスIgG(アルカリホスファターゼ標識)を0.2 µg/mlの20 mM Trisバッファー(pH 7.4)溶液として調製し、この溶液を洗浄後の各ウェルに100 µlずつ添加して37で30分間インキュベートした。

40

【0023】

その後、50 mM Trisバッファー(0.05% Tween-20を含む、pH 7.4)300 µlで三回洗浄した。p-アミノフェニルリン酸を、50 mM Trisバッファー pH 9.0、10 mM 塩化ナトリウム、10 mM 塩化マグネシウムの混合溶液により0.5 mMの溶液として調製した。この溶液を、洗浄後の各ウェルに100 µlずつ添加して37で30分間インキュベートした。インキュベート後、各ウェル中の溶液中に生成・遊離したp-アミノフェノールを、ディファレンシャルパルスボルタンメトリー(DPV)で測定した。添加したプリオン抗体の濃度に対して、DPV測定で得られた電流応答値をプロットしたものが図2である。濃度に依存して電流値が変化していることがわかる。この図2から、本手法による検出限界は数ng/mlであり、通常のELISA法と同程度の感度を有していることが明らかとなった。

50

【実施例 2】

【0024】

[プリオン感染細胞抽出液をサンプルとして用いた実験結果]

実サンプルは入手困難であるため、プリオン病に感染したマウス神経芽細胞腫細胞 (Neuro 2a) の細胞抽出液を、サンプルとして用いて実験を行った。プリオン病非感染の Neuro 2a の細胞抽出液を、対照サンプルとして用いた。感染、非感染細胞由来の抽出物をそれぞれ 96 穴プレートに 100 μ l ずつ添加し、室温で終夜静置した。その後、50 mM Tris バッファー (pH 7.4) 300 μ l で三回洗浄した。

【0025】

プリオン抗体 (マウス IgG1) を 20 mM Tris バッファー (pH 7.4) 溶液で 0.2 μ g/ml の濃度に調製し、この溶液を洗浄後の各ウェルに 100 μ l ずつ添加して 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。その後、50 mM Tris バッファー (0.05% Tween-20 を含む、pH 7.4) 300 μ l で三回洗浄した。抗マウス IgG (アルカリホスファターゼ標識) を 0.2 μ g/ml の 20 mM Tris バッファー (pH 7.4) 溶液として調製し、この溶液を洗浄後の各ウェルに 100 μ l ずつ添加して 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。

10

【0026】

その後、50 mM Tris バッファー (0.05% Tween-20 を含む、pH 7.4) 300 μ l で三回洗浄した。p-アミノフェニルリン酸を、50 mM Tris バッファー pH 9.0、10 mM 塩化ナトリウム、10 mM 塩化マグネシウムの混合溶液により 0.5 mM の溶液として調製した。この溶液を、洗浄後の各ウェルに 100 μ l ずつ添加して、37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、各ウェルの溶液中に生成・遊離した p-アミノフェノールを、ディファレンシャルパルスボルタンメトリー (DPV) 測定した。

20

【0027】

得られた測定結果 (電流値) を図 3 に示した。感染細胞サンプルで得られた電流値が、非感染細胞サンプルで得られた電流値よりも大きかった。この非感染細胞サンプルで得られた電流値を閾値として、この値を超えたかどうかによってプリオン病感染の診断が可能となる。

【実施例 3】

【0028】

本実施例は、本発明の検出チップの具体例を示すものである。図 3 に示したように、名刺大の大きさのプラスチック板に、それぞれが小さな凹部からなる試料注入部 A、試薬注入部 B、洗浄液注入部 C、反応部 D、検出部 E 及び廃液部 F を設け、これらを連結するマイクロ流路 (図 3 において各部をつなぐ連結線として示されている) を形成した。試料注入部 A は、サンプル注入部である。試薬注入部 B は、抗体や化合物溶液注入部である。洗浄液注入部 C は、洗浄バッファー等の注入部である。反応部 D は、サンプル中の抗原を捕捉し、抗原-抗体反応、酵素反応を行う反応部である。ここでの反応液は検出部 E へ運ばれ、電気化学シグナルとして検出される。廃液部 F は最終的に反応等の廃液を貯めるところである。

30

【0029】

例えば、本発明による BSE 検査は、各畜産場におけるその場診断を目的としているので、その検出チップや測定装置は非常に小型であることを特徴であり、かかるチップはそのような場合に便利に用いられる。本発明のチップ自体はプラスチックなどの安価な材料で構わない。凹部の底は、抗体の固定化や電気化学測定を考慮して、例えば、金薄膜が望ましい。

40

【産業上の利用可能性】

【0030】

抗原抗体反応を利用して抗原、例えば、異常プリオンを電気化学的に検出する方法であり、狂牛病等のプリオン病診断における生前 (と畜前) 診断役立ち、小型化及び低価格化の測定装置を提供できる可能性がある。

【図面の簡単な説明】

50

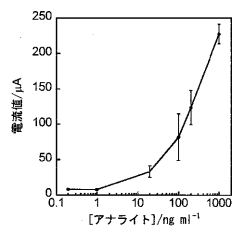
【 0 0 3 1 】

【図 1】測定電流値のアナライト濃度依存性を示す図である。

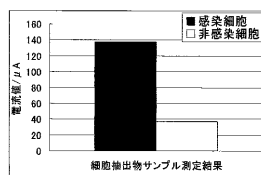
【図 2】プリオン感染細胞及び非感染細胞抽出物をサンプルとした場合の測定結果を示す図である。

【図 3】本発明の検出チップの例を示す図である。

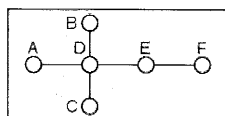
【図 1】



【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

(72)発明者 堂浦 克美

宮城県仙台市太白区三神峯1丁目3-4-501

(72)発明者 照屋 健太

宮城県仙台市青葉区中山3-10-16フォンテーヌ中山101

Fターム(参考) 2G058 AA09 DA01 GA12

专利名称(译)	电化学抗原检测方法，装置和检测芯片		
公开(公告)号	JP2007240425A	公开(公告)日	2007-09-20
申请号	JP2006065744	申请日	2006-03-10
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人九州工业大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人九州工业大学 国立大学法人东北大学		
[标]发明人	竹中繁織 大塚圭一 堂浦克美 照屋健太		
发明人	竹中 繁織 大塚 圭一 堂浦 克美 照屋 健太		
IPC分类号	G01N27/416 G01N33/53 G01N35/08 G01N37/00		
FI分类号	G01N27/46.336.N G01N33/53.D G01N27/46.336.B G01N35/08.A G01N37/00.101		
F-TERM分类号	2G058/AA09 2G058/DA01 2G058/GA12		
代理人(译)	前田 纯博		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供用于检测抗原的方法和小型化装置，例如通过侧面诊断检测异常朊蛋白的抗原。解决方案：在通过酶免疫测量方法检测抗原时，通过使用通过酶反应溶解的电化学活化的底物，通过测量活化底物的电化学响应的电化学抗原检测方法及其装置。该装置包括用于进行酶免疫测量方法的装置，用于测量在酶免疫测量方法中进行的酶反应产物响应的电化学测量装置，包括由例如酶组成的装置。伏安法或安培法。Z

