

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4044130号  
(P4044130)

(45) 発行日 平成20年2月6日 (2008.2.6)

(24) 登録日 平成19年11月22日 (2007.11.22)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 D

GO 1 N 33/536 (2006.01)

GO 1 N 33/536 A

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 O 1

GO 1 N 37/00 (2006.01)

GO 1 N 37/00 1 O 1

請求項の数 15 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2007-532714 (P2007-532714)  
 (86) (22) 出願日 平成19年4月9日 (2007.4.9)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2007/057830  
 審査請求日 平成19年7月10日 (2007.7.10)  
 (31) 優先権主張番号 特願2006-149733 (P2006-149733)  
 (32) 優先日 平成18年5月30日 (2006.5.30)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(出願人による申告) 新エネルギー・産業技術総合開発  
 機構、先進ナノバイオデバイスプロジェクト委託研究、  
 産業活力再生特別措置法第30条の適用を受ける特許出  
 願

早期審査対象出願

(73) 特許権者 000005821  
 松下電器産業株式会社  
 大阪府門真市大字門真1006番地  
 (74) 代理人 100107641  
 弁理士 鎌田 耕一  
 (72) 発明者 畠岡 由香利  
 大阪府門真市大字門真1006番地 松下  
 電器産業株式会社内

審査官 白形 由美子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫学的測定法およびチップ

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

試料溶液に含まれる測定対象抗原の量を、チップを用いて測定する方法であって、  
 前記チップは、反応チャンバ、溶媒保持チャンバ、廃液チャンバ、および前記試料溶液  
 が注入される注入孔を有し、

前記注入孔と前記反応チャンバとの間は第1流路により接続されており、  
 前記注入孔と前記溶媒保持チャンバとの間は第2流路により接続されており、  
 前記溶媒保持チャンバと前記反応チャンバとの間は第3流路により接続されており、  
 前記反応チャンバと前記廃液チャンバとの間は第4流路により接続されており、  
 前記注入孔から、前記第2流路、前記溶媒保持チャンバ、および前記第3流路を経由し  
 て前記反応チャンバまでの間に、測定用試薬が配置されており、

前記方法は、

前記注入孔から前記試料溶液を注入し、前記試料溶液を、前記第1流路を通して前記反  
 応チャンバと、前記第2流路を通して前記溶媒保持チャンバとに分ける工程、

前記反応チャンバにおいて、前記試料溶液に含まれる測定対象抗原と、前記測定対象抗  
 原に特異的に結合する抗体とを結合させ、抗原抗体複合体を得る工程、

前記反応チャンバ中の前記試料溶液を、前記第4流路を介して前記廃液チャンバに送る  
 ことにより、

i) 前記抗原抗体複合体、および

ii) 前記測定対象抗原と結合していない抗体、

10

20

から選ばれる一方を前記反応チャンバに残すとともに、他方を前記廃液チャンバに移動させて、前記抗原抗体複合体と、前記測定対象抗原と結合していない抗体と、を分離する工程、

前記溶媒保持チャンバに保持されている前記試料溶液を、

A 1) 前記反応チャンバに前記第 3 流路を介して、または

B 1) 前記廃液チャンバに前記第 3 流路および前記第 4 流路を介して、

前記測定用試薬と共に注入する工程、

前記抗原抗体複合体および前記測定対象抗原と結合していない抗体のうち、

A 2) 前記反応チャンバに残っている方の量、または

B 2) 前記廃液チャンバに移動させた方の量、

を測定する工程、および

前記測定する工程において測定された量から、前記試料溶液に含まれる前記測定対象抗原の量を算出する工程、

をこの順に有する、方法。

#### 【請求項 2】

前記反応チャンバに固相抗原が固定されており、前記測定対象抗原と結合していない抗体が、前記固相抗原に結合した状態にあり、前記分離する工程において、前記測定対象抗原と結合していない抗体が前記反応チャンバに残され、前記抗原抗体複合体が前記廃液チャンバに移動する、請求項 1 に記載の方法。

#### 【請求項 3】

前記反応チャンバに固相抗体が固定されており、前記抗原抗体複合体が、前記固相抗体と前記測定対象抗原と前記抗体との結合体であり、前記分離する工程において、前記抗原抗体複合体が前記反応チャンバに残され、前記測定対象抗原と結合していない抗体が前記廃液チャンバに移動する、請求項 1 に記載の方法。

#### 【請求項 4】

試料溶液に含まれる測定対象抗原の量を、チップを用いて測定する方法であって、

前記チップは、反応チャンバ、溶媒保持チャンバ、廃液チャンバ、および前記試料溶液が注入される注入孔を有し、

前記注入孔と前記反応チャンバとの間は第 1 流路により接続されており、

前記注入孔と前記溶媒保持チャンバとの間は第 2 流路により接続されており、

前記溶媒保持チャンバと前記廃液チャンバとの間は第 3 流路により接続されており、

前記反応チャンバと前記廃液チャンバとの間は第 4 流路により接続されており、

前記注入孔から、前記第 2 流路、前記溶媒保持チャンバ、および前記第 3 流路を経由して前記廃液チャンバまでの間に、測定用試薬が配置されており、

前記方法は、

前記注入孔から前記試料溶液を注入し、前記試料溶液を、前記第 1 流路を通して前記反応チャンバと、前記第 2 流路を通して前記溶媒保持チャンバとに分ける工程、

前記反応チャンバにおいて、前記試料溶液に含まれる測定対象抗原と、前記測定対象抗原に特異的に結合する抗体とを結合させ、抗原抗体複合体を得る工程、

前記反応チャンバ中の前記試料溶液を、前記第 4 流路を介して前記廃液チャンバに送ることにより、

i) 前記抗原抗体複合体、および

ii) 前記測定対象抗原と結合していない抗体、

から選ばれる一方を前記反応チャンバに残すとともに、他方を前記廃液チャンバに移動させて、前記抗原抗体複合体と、前記測定対象抗原と結合していない抗体と、を分離する工程、

前記廃液チャンバに、前記溶媒保持チャンバに保持されている前記試料溶液を、前記第 3 流路を介して前記測定用試薬と共に注入する工程、

前記抗原抗体複合体および前記測定対象抗原と結合していない抗体のうち、前記廃液チャンバに移動させた方の量を測定する工程、および

10

20

30

40

50

前記測定する工程において測定された量から、前記試料溶液に含まれる前記測定対象抗原の量を算出する工程、

をこの順に有する、方法。

【請求項 5】

前記反応チャンバに固相抗原が固定されており、前記測定対象抗原と結合していない抗体が、前記固相抗原に結合した状態にあり、前記分離する工程において、前記測定対象抗原と結合していない抗体が前記反応チャンバに残され、前記抗原抗体複合体が前記廃液チャンバに移動する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記反応チャンバに固相抗体が固定されており、前記抗原抗体複合体が、前記固相抗体と前記測定対象抗原と前記抗体との結合体であり、前記分離する工程において、前記抗原抗体複合体が前記反応チャンバに残され、前記測定対象抗原と結合していない抗体が前記廃液チャンバに移動する、請求項 4 に記載の方法。

10

【請求項 7】

試料溶液に含まれる測定対象抗原の量を測定する方法であって、

反応チャンバにおいて、前記測定対象抗原と、前記測定対象抗原に特異的に結合する抗体とを結合させ、抗原抗体複合体を得る工程、

前記抗原抗体複合体と、前記測定対象抗原と結合していない抗体と、を分離する工程、

前記抗原抗体複合体または前記測定対象抗原と結合していない抗体に、測定用試薬を含有する前記試料溶液を添加することにより、測定溶液を得る工程、

20

前記測定溶液に含まれる前記抗原抗体複合体または前記測定対象抗原と結合していない抗体の量を測定する工程、および

前記測定する工程において測定された量から、前記試料溶液に含まれる前記測定対象抗原の量を算出する工程、

を有する方法。

【請求項 8】

前記反応チャンバに固相抗原が固定されており、前記測定対象抗原と結合していない抗体が、前記固相抗原に結合した状態にある、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記反応チャンバに固相抗体が固定されており、前記抗原抗体複合体が、前記固相抗体と前記測定対象抗原と前記抗体との結合体である、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 10】

試料溶液に含まれる測定対象抗原の量を測定するためのチップであって、

前記チップは、反応チャンバ、溶媒保持チャンバ、廃液チャンバ、および前記試料溶液が注入される注入孔を有し、

前記注入孔と前記反応チャンバとの間は第 1 流路により接続されており、

前記注入孔と前記溶媒保持チャンバとの間は第 2 流路により接続されており、

前記溶媒保持チャンバと前記反応チャンバとの間は第 3 流路により接続されており、

前記反応チャンバと前記廃液チャンバとの間は第 4 流路により接続されており、

前記注入孔から注入された前記試料溶液は、前記第 1 流路を通過して前記反応チャンバと、前記第 2 流路を通過して前記溶媒保持チャンバとに分かれ、

40

前記反応チャンバ内では、前記測定対象抗原と、前記測定対象抗原に特異的に結合する抗体とを結合させ、抗原抗体複合体が得られ、

前記反応チャンバ中の前記試料溶液が、前記第 4 流路を通過して前記廃液チャンバに流れることにより、

i) 前記抗原抗体複合体、および

ii) 前記測定対象抗原と結合していない抗体、

から選ばれる一方が前記反応チャンバに残されるとともに、他方が前記廃液チャンバに移動して、前記抗原抗体複合体と、前記測定対象抗原と結合していない抗体と、が分離され、

50

前記注入孔から、前記第 2 流路、前記溶媒保持チャンバ、および前記第 3 流路を経由して前記反応チャンバまでの間に、測定用試薬が配置されており、

前記分離の後で、前記反応チャンバに、前記溶媒保持チャンバに保持されている前記試料溶液が、前記第 3 流路を通して前記測定用試薬と共に注入される、チップ。

【請求項 1 1】

前記反応チャンバに固相抗原が固定されており、前記測定対象抗原と結合していない抗体が、前記固相抗原に結合した状態にあり、前記分離において、前記測定対象抗原と結合していない抗体が前記反応チャンバに残され、前記抗原抗体複合体が前記廃液チャンバに移動する、請求項 1 0 に記載のチップ。

10

【請求項 1 2】

前記反応チャンバに固相抗体が固定されており、前記抗原抗体複合体が、前記固相抗体と前記測定対象抗原と前記抗体との結合体であり、前記分離において、前記抗原抗体複合体が前記反応チャンバに残され、前記測定対象抗原と結合していない抗体が前記廃液チャンバに移動する、請求項 1 0 に記載のチップ。

【請求項 1 3】

試料溶液に含まれる測定対象抗原の量を測定するためのチップであって、

前記チップは、反応チャンバ、溶媒保持チャンバ、廃液チャンバ、および前記試料溶液が注入される注入孔を有し、

前記注入孔と前記反応チャンバとの間は第 1 流路により接続されており、

前記注入孔と前記溶媒保持チャンバとの間は第 2 流路により接続されており、

前記溶媒保持チャンバと前記廃液チャンバとの間は第 3 流路により接続されており、

前記反応チャンバと前記廃液チャンバとの間は第 4 流路により接続されており、

前記注入孔から注入された前記試料溶液は、前記第 1 流路を通して前記反応チャンバと、前記第 2 流路を通して前記溶媒保持チャンバとに分かれ、

前記反応チャンバ内では、前記測定対象抗原と、前記測定対象抗原に特異的に結合する抗体とを結合させ、抗原抗体複合体が得られ、

前記反応チャンバ中の前記試料溶液が、前記第 4 流路を通して前記廃液チャンバに流れることにより、

i) 前記抗原抗体複合体、および

ii) 前記測定対象抗原と結合していない抗体、

から選ばれる一方が前記反応チャンバに残されるとともに、他方が前記廃液チャンバに移動して、前記抗原抗体複合体と、前記測定対象抗原と結合していない抗体と、が分離され、

前記注入孔から、前記第 2 流路、前記溶媒保持チャンバ、および前記第 3 流路を経由して前記廃液チャンバまでの間に、測定用試薬が配置されており、

前記分離の後で、前記廃液チャンバに、前記溶媒保持チャンバに保持されている前記試料溶液が、前記第 3 流路を通して前記測定用試薬と共に注入される、

チップ。

【請求項 1 4】

前記反応チャンバに固相抗原が固定されており、前記測定対象抗原と結合していない抗体が、前記固相抗原に結合した状態にあり、前記分離において、前記測定対象抗原と結合していない抗体が前記反応チャンバに残され、前記抗原抗体複合体が前記廃液チャンバに移動する、請求項 1 3 に記載のチップ。

【請求項 1 5】

前記反応チャンバに固相抗体が固定されており、前記抗原抗体複合体が、前記固相抗体と前記測定対象抗原と前記抗体との結合体であり、前記分離において、前記抗原抗体複合体が前記反応チャンバに残され、前記測定対象抗原と結合していない抗体が前記廃液チャンバに移動する、請求項 1 3 に記載のチップ。

【発明の詳細な説明】

50

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、抗原抗体反応を利用して試料溶液中の特定成分の量を測定する免疫学的測定法に関し、特に、チップ上での実施に適した免疫学的測定法に関する。また、本発明は、この免疫学的測定法の実施に適したチップに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

生体試料（例えば、血液）に含有されるアレルギー反応の原因物質、ウイルスおよび細菌などのタンパク質を、高精度に同定および定量する方法として、免疫学的測定法が注目されている。

10

## 【0003】

免疫学的測定法は、免疫比濁法と、標識化免疫法とに大別される。免疫比濁法は、抗原抗体反応によって生じる抗原抗体複合体に起因する、試料溶液の濁度変化を測定する方法である。標識化免疫法は、標識物質で標識された抗体を使用し、抗原抗体反応後の標識物質の変化を測定する方法である。

## 【0004】

標識化免疫法は、標識物質の種類に応じて細分化される。例えば、標識物質として放射性同位元素を使用するラジオイムノアッセイ、酵素を使用するエンザイムイムノアッセイ（EIA）、蛍光体を使用する蛍光イムノアッセイなどが挙げられる。EIAは、他の標識化免疫法と比較すると、標識物質の安全性が高く、簡便な操作によって実施でき、測定精度も高いため、盛んに利用されている。

20

## 【0005】

代表的なEIAとしては、固相酵素免疫検定法（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay；ELISA）が例示できる。ELISAの一例について、図1を参照して説明する。

## 【0006】

（工程1-A：固相抗原の形成）

測定対象抗原のエピトープと同一のエピトープを有する捕獲抗原を含有する溶液を、反応チャンバ7に導入し、所定温度で所定時間保持することにより、捕獲抗原を反応チャンバ7の表面に吸着させる。その後、吸着させた捕獲抗原を、後の抗原抗体反応および酵素反応には関与しないタンパク質で覆う（ブロックング）。これにより、反応チャンバ7の内部に固相抗原6を形成する。固相抗原6は、反応チャンバ7の表面に固定された状態にあり、後述する洗浄によって反応チャンバ7から除去されない。

30

## 【0007】

（工程1-B：測定対象抗原および固相抗原と、抗体との結合反応）

試料溶液9に、測定対象抗原2に特異的に結合する抗体3を添加する。抗体3は、標識物質（酵素）4で標識された状態にある。その後、当該抗体3を含有する試料溶液9を、反応チャンバ7に導入する。これにより、反応チャンバ7において、固相抗原6および測定対象抗原2と、抗体3との間で、抗原抗体反応が進行する。

## 【0008】

（工程1-C：未反応の抗体および抗原抗体複合体の除去）

洗浄液を用い、反応チャンバ7の内部を洗浄する。これにより、測定対象抗原2に抗体3が結合することにより形成された抗原抗体複合体と、固相抗原6に結合しなかった抗体3とが、反応チャンバ7から除去され、固相抗原6と抗体3との結合体が、反応チャンバ7に残される。

40

## 【0009】

（工程1-D：標識物質の量の測定）

反応チャンバ7に残された固相抗原6と抗体3との結合体が有する標識物質4の量を測定する。当該測定は、例えば次のようにして実施される。まず、標識物質4と反応する測定用試薬（例えば、酵素の基質）を含有する溶液を調製する。当該溶液は、測定用試薬を、Tris-HClバッファに代表される緩衝液に添加することにより調製する。次に、当該溶

50

液を反応チャンバ7に導入することにより、反応チャンバ7において、固相抗原6と抗体3との結合体と、測定用試薬と、を含有する測定溶液10を得る。測定溶液10中で、測定用試薬と標識物質4との反応を進行させた後、反応生成物の量を反映したシグナルを検出する。

【0010】

試料溶液9中の測定対象抗原2の量は、当該測定の結果、固相抗原6の量、および工程1-Bにおいて反応チャンバに導入した試料溶液9の量に基づき算出される。

【0011】

試料溶液中の測定対象物質の量を、微量の試料溶液を用い、短時間に測定する観点から、チップ型のバイオセンサが注目されている。例えば、特開平2—062952号公報は、絶縁性の基板、基板上に配置された電極系、電極系上に配置された酵素反応層、ならびに電極系および酵素反応層が露出するように基板上に配置された、切り欠き部を有する絶縁層を備えた、チップ型のバイオセンサを開示する。酵素反応層は、酸化還元酵素および電子メディエーターなどに代表される、酵素サイクリング反応を誘導するための測定用試薬を含有する。酸化還元酵素としては、測定対象物質を基質とする酵素が使用される。例えば、グルコース量を測定する場合はグルコースオキシダーゼが、また例えば、コレステロール量を測定する場合はコレステロールオキシダーゼが使用される。このバイオセンサでは、切り欠き部に試料溶液を滴下し、測定用試薬を試料溶液に溶解させることにより、電子メディエーターを介した測定対象物質と酵素との反応（酵素サイクリング反応）が進行する。試料溶液中の測定対象物質の量は、酵素反応により還元された電子メディエーターを電気化学的に酸化することにより得られる、酸化電流値に基づいて算出される。

【0012】

図1に示すような従来の免疫学的測定法では、上記のとおり、緩衝液を溶媒とする測定溶液10を用いて工程1-Dを実施する。このため、当該免疫学的測定法をチップ上で実施するためには、緩衝液をチップの外部から供給する、または緩衝液を予めチップ上に保持させておく必要がある。しかし、緩衝液を外部から供給する場合、当該供給のための手間が余分にかかる。緩衝液をチップ上に保持させる場合は、当該液を、密封状態で、かつ測定時には、標識物質と反応する成分を含有しつつ反応チャンバに容易に導入できる状態で、チップ上に保持させることが望ましい。しかし、このような保持状態をチップ上で形成することは容易ではない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明は、測定試料の溶媒をチップの外部から供給したりチップ上に予め保持させたりする必要のない、チップ上での実施に適した免疫学的測定法を提供することを目的とする。また、本発明は、この免疫学的測定法の実施に適したチップを提供することを目的とする。また、本発明は、このチップを用いた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】

【0014】

従来、免疫学的測定法において、測定溶液の溶媒として、タンパク質などの測定対象物質を含有しない、緩衝液を使用することが重要と考えられていた。ところが、本発明者は、意外にも、緩衝液に代えて、タンパク質などの測定対象物質を含有する生体試料を測定溶液の溶媒として使用しても、測定対象物質の量を反映したシグナルを検出できることを見出した。

【0015】

本発明は、試料溶液に含まれる測定対象抗原の量を、チップを用いて測定する方法であって、前記チップは、反応チャンバ、溶媒保持チャンバ、廃液チャンバ、および前記試料溶液が注入される注入孔を有し、前記注入孔と前記反応チャンバとの間は第1流路により接続されており、前記注入孔と前記溶媒保持チャンバとの間は第2流路により接続されており、前記溶媒保持チャンバと前記反応チャンバとの間は第3流路により接続されており

、前記反応チャンバと前記廃液チャンバとの間は第4流路により接続されており、前記注入孔から、前記第2流路、前記溶媒保持チャンバ、および前記第3流路を経由して前記反応チャンバまでの間に、測定用試薬が配置されており、前記方法は、前記注入孔から前記試料溶液を注入し、前記試料溶液を、前記第1流路を通して前記反応チャンバと、前記第2流路を通して前記溶媒保持チャンバとに分ける工程、前記反応チャンバにおいて、前記試料溶液に含まれる測定対象抗原と、前記測定対象抗原に特異的に結合する抗体とを結合させ、抗原抗体複合体を得る工程、前記反応チャンバ中の前記試料溶液を、前記第4流路を介して前記廃液チャンバに送ることにより、i)前記抗原抗体複合体、およびii)前記測定対象抗原と結合していない抗体、から選ばれる一方を前記反応チャンバに残すとともに、他方を前記廃液チャンバに移動させて、前記抗原抗体複合体と、前記測定対象抗原と結合していない抗体と、を分離する工程、前記溶媒保持チャンバに保持されている前記試料溶液を、A1)前記反応チャンバに前記第3流路を介して、またはB1)前記廃液チャンバに前記第3流路および前記第4流路を介して、前記測定用試薬と共に注入する工程、前記抗原抗体複合体および前記測定対象抗原と結合していない抗体のうち、A2)前記反応チャンバに残っている方の量、またはB2)前記廃液チャンバに移動させた方の量、を測定する工程、および前記測定する工程において測定された量から、前記試料溶液に含まれる前記測定対象抗原の量を算出する工程、をこの順に有する、方法を提供する。

【0016】

本発明は、その別の側面から、試料溶液に含まれる測定対象抗原の量を、チップを用いて測定する方法であって、前記チップは、反応チャンバ、溶媒保持チャンバ、廃液チャンバ、および前記試料溶液が注入される注入孔を有し、前記注入孔と前記反応チャンバとの間は第1流路により接続されており、前記注入孔と前記溶媒保持チャンバとの間は第2流路により接続されており、前記溶媒保持チャンバと前記廃液チャンバとの間は第3流路により接続されており、前記反応チャンバと前記廃液チャンバとの間は第4流路により接続されており、前記注入孔から、前記第2流路、前記溶媒保持チャンバ、および前記第3流路を経由して前記廃液チャンバまでの間に、測定用試薬が配置されており、前記方法は、前記注入孔から前記試料溶液を注入し、前記試料溶液を、前記第1流路を通して前記反応チャンバと、前記第2流路を通して前記溶媒保持チャンバとに分ける工程、前記反応チャンバにおいて、前記試料溶液に含まれる測定対象抗原と、前記測定対象抗原に特異的に結合する抗体とを結合させ、抗原抗体複合体を得る工程、前記反応チャンバ中の前記試料溶液を、前記第4流路を介して前記廃液チャンバに送ることにより、i)前記抗原抗体複合体、およびii)前記測定対象抗原と結合していない抗体、から選ばれる一方を前記反応チャンバに残すとともに、他方を前記廃液チャンバに移動させて、前記抗原抗体複合体と、前記測定対象抗原と結合していない抗体と、を分離する工程、前記廃液チャンバに、前記溶媒保持チャンバに保持されている前記試料溶液を、前記第3流路を介して前記測定用試薬と共に注入する工程、前記抗原抗体複合体および前記測定対象抗原と結合していない抗体のうち、前記廃液チャンバに移動させた方の量を測定する工程、および前記測定する工程において測定された量から、前記試料溶液に含まれる前記測定対象抗原の量を算出する工程、をこの順に有する、方法を提供する。

【0017】

本発明は、その別の側面から、試料溶液に含まれる測定対象抗原の量を測定する方法であって、反応チャンバにおいて、前記測定対象抗原と、前記測定対象抗原に特異的に結合する抗体とを結合させ、抗原抗体複合体を得る工程、前記抗原抗体複合体と、前記測定対象抗原と結合していない抗体と、を分離する工程、前記抗原抗体複合体または前記測定対象抗原と結合していない抗体に、測定用試薬を含有する前記試料溶液を添加することにより、測定溶液を得る工程、前記測定溶液に含まれる前記抗原抗体複合体または前記測定対象抗原と結合していない抗体の量を測定する工程、および前記測定する工程において測定された量から、前記試料溶液に含まれる前記測定対象抗原の量を算出する工程、を有する方法を提供する。

【0018】

本発明は、その別の側面から、試料溶液に含まれる測定対象抗原の量を測定するためのチップであって、前記チップは、反応チャンバ、溶媒保持チャンバ、廃液チャンバ、および前記試料溶液が注入される注入孔を有し、前記注入孔と前記反応チャンバとの間は第1流路により接続されており、前記注入孔と前記溶媒保持チャンバとの間は第2流路により接続されており、前記溶媒保持チャンバと前記反応チャンバとの間は第3流路により接続されており、前記反応チャンバと前記廃液チャンバとの間は第4流路により接続されており、前記注入孔から注入された前記試料溶液は、前記第1流路を通して前記反応チャンバと、前記第2流路を通して前記溶媒保持チャンバとに分かれ、前記反応チャンバ内では、前記測定対象抗原と、前記測定対象抗原に特異的に結合する抗体とを結合させ、抗原抗体複合体が得られ、前記反応チャンバ中の前記試料溶液が、前記第4流路を通して前記廃液チャンバに流れることにより、i)前記抗原抗体複合体、およびii)前記測定対象抗原と結合していない抗体、から選ばれる一方が前記反応チャンバに残されるとともに、他方が前記廃液チャンバに移動して、前記抗原抗体複合体と、前記測定対象抗原と結合していない抗体と、が分離され、前記注入孔から、前記第2流路、前記溶媒保持チャンバ、および前記第3流路を経由して前記反応チャンバまでの間に、測定用試薬が配置されており、前記分離の後で、前記反応チャンバに、前記溶媒保持チャンバに保持されている前記試料溶液が、前記第3流路を通して前記測定用試薬と共に注入される、チップを提供する。

10

**【0019】**

本発明は、その別の側面から、試料溶液に含まれる測定対象抗原の量を測定するためのチップであって、前記チップは、反応チャンバ、溶媒保持チャンバ、廃液チャンバ、および前記試料溶液が注入される注入孔を有し、前記注入孔と前記反応チャンバとの間は第1流路により接続されており、前記注入孔と前記溶媒保持チャンバとの間は第2流路により接続されており、前記溶媒保持チャンバと前記廃液チャンバとの間は第3流路により接続されており、前記反応チャンバと前記廃液チャンバとの間は第4流路により接続されており、前記注入孔から注入された前記試料溶液は、前記第1流路を通して前記反応チャンバと、前記第2流路を通して前記溶媒保持チャンバとに分かれ、前記反応チャンバ内では、前記測定対象抗原と、前記測定対象抗原に特異的に結合する抗体とを結合させ、抗原抗体複合体が得られ、前記反応チャンバ中の前記試料溶液が、前記第4流路を通して前記廃液チャンバに流れることにより、i)前記抗原抗体複合体、およびii)前記測定対象抗原と結合していない抗体、から選ばれる一方が前記反応チャンバに残されるとともに、他方が前記廃液チャンバに移動して、前記抗原抗体複合体と、前記測定対象抗原と結合していない抗体と、が分離され、前記注入孔から、前記第2流路、前記溶媒保持チャンバ、および前記第3流路を経由して前記廃液チャンバまでの間に、測定用試薬が配置されており、前記分離の後で、前記廃液チャンバに、前記溶媒保持チャンバに保持されている前記試料溶液が、前記第3流路を通して前記測定用試薬と共に注入される、チップを提供する。

20

30

**【0020】**

本発明によれば、免疫学的測定法の実施に際し、緩衝液を使用することなしに、測定対象物質の量を反映したシグナルを検出するための測定溶液を得ることができる。

**【発明を実施するための最良の形態】****【0021】**

本発明の免疫学的測定法の一例について、図2の工程図を用いて説明する。

40

**【0022】**

(工程2 - A : 固相抗原の形成)

試料溶液中に含有される特定のタンパク質(測定対象抗原2)のエピトープと同一のエピトープを有する捕獲抗原を、反応チャンバ7の表面に所定量固定することにより、固相抗原6を形成する。捕獲抗原の固定は、例えば、従来型のELISAにおける工程1 - Aと同様にして行えばよい。

**【0023】**

反応チャンバ7の材質としては、ポリスチレン、ポリエチレンテレフタレート(PET)、ポリカーボネートおよびポリジメチルシロキサンなどの樹脂、ガラス、磁性体などを

50

例示できる。反応チャンバ7は、チューブ型、マイクロプレートに代表されるウェル型などの、液体を保持可能な形状を有することが望ましい。

【0024】

(工程2 - B : 結合工程)

まず、試料溶液の一部1を所定量分注する。試料溶液としては、血液、尿、唾液、汗、涙などの液状の生体試料を例示できる。続いて、試料溶液の一部1に、標識物質4によって標識された抗体3を添加する。抗体3は、測定対象抗原2に特異的に結合する一次抗体である。試料溶液の他の一部8は、抗体3を添加しない状態で保存する。抗体3は、市販の抗体であってもよいし、実験動物を利用して独自に作成した抗体であってもよい。抗体3は、ポリクローナル抗体であってもよいが、抗原抗体反応の特異性および感度などを高める観点からは、モノクローナル抗体が好ましい。測定対象抗原2としては、C反応性蛋白(CRP)、血清アミロイドA、トロポニンT、クレアチンキナーゼMB、レチノール結合蛋白などの、臨床的な注目度の高いタンパク質を例示できる。標識物質4は、酵素が好ましいが、蛍光色素、さらには放射性同位体であってもよい。

10

【0025】

標識された抗体3を添加した直後の状態にある、試料溶液の一部1を、固相抗原6が固定された反応チャンバ7に導入する。この操作により、試料溶液の一部1が反応チャンバ7に導入される。導入後の試料溶液の一部1を、所定温度で所定時間、反応チャンバ7に保持する。これにより、固相抗原6および測定対象抗原2と、抗体3との間で抗原抗体反応が競合的に進行し、反応チャンバ7において、測定対象抗原2と抗体3との結合体である抗原抗体複合体と、固相抗原6と抗体3との結合体とが形成される。固相抗原6と抗体3との結合体は、測定対象抗原2に結合していないため、本明細書では、抗体3と同様「測定対象抗原に結合していない抗体」として扱う。このように、本発明の免疫学的測定法は、反応チャンバに固相抗原が固定されており、結合工程において、抗原抗体複合体と、固相抗原に抗体が結合した状態にある、測定対象抗原と結合していない抗体と、を得るようにしてよい。

20

【0026】

反応チャンバ7における抗原抗体反応は、非競合反応であってもよい。非競合反応は、標識された抗体3を添加した試料溶液の一部1を、反応チャンバ7に導入する前に所定温度で所定時間保持し、測定対象抗原2と標識された抗体3との反応を定常状態に到達させた後、当該試料溶液の一部1を反応チャンバ7に導入し、測定対象抗原2に結合していない抗体3と、固相抗原6とを反応させることより進行させればよい。抗原抗体反応を進行させるための温度および時間は、抗原および抗体の種類に応じて適宜設定すればよい。以降の抗原抗体反応においても同様である。

30

【0027】

(工程2 - C : 分離工程)

試料溶液の一部1を、例えばピペットを使用し、反応チャンバ7から除去する。これにより、抗原抗体複合体が、反応チャンバ7から取り除かれるとともに、測定対象抗原と結合していない抗体が反応チャンバ7に残される。こうして、結合工程(工程2 - B)において得た、抗原抗体複合体と、測定対象抗原と結合していない抗体と、を分離する。分離の精度を高める観点からは、試料溶液を除去した後、さらに、Tris-HClバッファーに代表される洗浄液を用い、反応チャンバを洗浄することが好ましい。

40

【0028】

(工程2 - D : 測定工程)

反応チャンバ7に残された、測定対象抗原と結合していない抗体における標識物質4の量を測定する。当該測定は、例えば次のように実施すればよい。まず、測定用試薬を含む溶液を調製する。この際、当該溶液の溶媒として、結合工程(工程2 - B)において保存した、試料溶液の他の一部8を用いる。測定用試薬は、標識物質4の種類に応じて選択すればよい。例えば、標識物質4がアルカリホスファターゼ(ALP)に代表される酵素であれば、当該酵素の基質とすればよい。ALPの基質としては、p - ニトロフェニル

50

リン酸 ( p N P P ) を例示できる。次に、当該溶液を反応チャンバ 7 に導入することにより、反応チャンバ 7 において、測定対象抗原と結合していない抗体と、測定用試薬と、を含有する測定溶液を得る。こうして、試料溶液の他の一部であって、試料溶液の上記一部と分離された後に添加された測定用試薬を含有する当該他の一部と、測定対象抗原と結合していない抗体とを混合することにより、測定溶液を得る。このように、本発明の免疫学的測定法は、試料溶液を溶媒として用いることにより、緩衝液を使用せずに、測定溶液を得る。続いて、測定溶液中で、測定用試薬と標識物質 4 との反応を進行させた後、公知の光学的測定手段および電気化学的測定手段などを用いて、反応生成物の量を反映するシグナル量を検出する。

【 0 0 2 9 】

10

上記のとおり、従来、測定溶液の溶媒としては、タンパク質を含有しない、緩衝液を使用することが重要と考えられていた。反応を阻害する物質なしに測定反応を行うためである。ところが、こうして試料溶液を溶媒として用いても、良好な測定を実施できる測定溶液を調製できるようなのである。後述する実施例に示すように、緩衝液を溶媒として使用した場合に匹敵する程度に優れた精度で、測定対象物質の量を反映したシグナルを検出できるためである。

【 0 0 3 0 】

( 算出工程 )

測定工程において測定された量 ( 測定結果 ) に基づき、測定対象抗原の量を算出する。より具体的には、当該測定結果、反応チャンバ 7 に固定した固相抗原 6 の量、および結合工程 ( 工程 2 - B ) において反応チャンバに導入した試料溶液の一部 1 の量に基づき、測定対象抗原の量を算出する。測定対象抗原の量とは、当該量に関連付けられる物理量、例えば濃度であってよい。こうして、測定工程において測定された、測定対象抗原と結合していない抗体の量から、または後述するように抗原抗体複合体の量から、試料溶液に含まれる測定対象抗原の量を算出する。

20

【 0 0 3 1 】

本発明の免疫学的測定法の別例について、図 8 の工程図を用いて説明する。この例は、抗体と測定対象抗原との抗原抗体反応を、サンドイッチ法によって実施する。

【 0 0 3 2 】

( 工程 8 - A : 固相抗体の形成 )

30

試料溶液中に含有される測定対象抗原 2 に結合する捕獲抗体を、反応チャンバ 7 の表面に所定量固定することにより、固相抗体 1 9 を形成する。捕獲抗体の固定は、例えば、図 2 に示す免疫学的測定法における工程 2 - A と同様に行えばよい。

【 0 0 3 3 】

( 工程 8 - B ~ D : 結合工程 )

試料溶液を所定量分注する。これにより、試料溶液の一部 1、および試料溶液の他の一部 8 を用意する。

【 0 0 3 4 】

試料溶液の一部 1 を、固相抗体 1 9 が固定された反応チャンバ 7 に導入する ( 工程 8 - B )。この操作により、試料溶液の一部 1 が反応チャンバ 7 に導入される。導入した試料溶液の一部 1 を、反応チャンバ 7 において、所定温度で所定時間保持する。これにより、固相抗体 1 9 と測定対象抗原 2 との間で抗原抗体反応が進行し、反応チャンバ 7 において、測定対象抗原 2 と固相抗体 1 9 との結合体が形成される。

40

【 0 0 3 5 】

続いて、例えばピペットを使用し、試料溶液の一部 1 を反応チャンバ 7 から除去する ( 工程 8 - C )。これにより、固相抗体 1 9 に結合しなかった測定対象抗原 2 が反応チャンバ 7 から取り除かれ、測定対象抗原 2 と固相抗体 1 9 との結合体が反応チャンバ 7 に残される。固相抗体 1 9 に結合しなかった測定対象抗原 2 をより確実に反応チャンバ 7 から取り除く観点からは、試料溶液の一部 1 を除去した後、さらに、Tris-HCl バッファに代表される洗浄液を用いて反応チャンバ 7 を洗浄することが好ましい。

50

## 【 0 0 3 6 】

その後、溶液 3 0 を反応チャンバ 7 に導入する。溶液 3 0 は、標識物質 4 によって標識された抗体 3 を、測定対象抗原 2 のエピトープと同一のエピトープを有するタンパク質を含有しない溶媒に所定量添加することにより調製する。抗体 3 は、固相抗体 1 9 に結合した状態にある測定対象抗原 2 に対しても結合できる一次抗体を使用する。溶液 3 0 の溶媒としては、Tris-HCl バッファを例示できる。導入した溶液 3 0 を、反応チャンバ 7 において、所定温度で所定時間保持する（工程 8 - D）。これにより、固相抗体 1 9 に結合した状態にある測定対象抗原 2 と、標識された抗体 3 との間で抗原抗体反応が進行する。当該抗原抗体反応により、反応チャンバ 7 において、固相抗体 1 9 と測定対象抗原 2 と抗体 3 との結合体である抗原抗体複合体と、標識された抗体 3 の残部 2 1 である、測定対象抗原と結合していない抗体とが得られる。抗体 3 の残部 2 1 は、反応チャンバ 7 の表面から遊離した状態で、溶液 3 0 中に存在する。

10

## 【 0 0 3 7 】

このように、本発明の免疫学的測定法は、反応チャンバに固相抗体が配置されており、結合工程において、固相抗体および測定対象抗原を結合させ、さらに、固相抗体に結合した状態にある測定対象抗原に、抗体の一部を結合させることにより、固相抗体と測定対象抗原と抗体の上記一部との結合体である、抗原抗体複合体と、抗体の残部である、測定対象抗原と結合していない抗体と、を得るようにしてよい。

## 【 0 0 3 8 】

（工程 8 - E：分離工程）

20

溶液 3 0 を反応チャンバ 7 から除去する（工程 8 - E）。当該除去は、工程 8 - C と同様にして実施すればよい。これにより、測定対象抗原と結合していない抗体が反応チャンバ 7 から取り除かれ、抗原抗体複合体が反応チャンバ 7 に残される。こうして、工程 8 - D において得た抗原抗体複合体と、測定対象抗原と結合していない抗体と、を分離する。

## 【 0 0 3 9 】

（工程 8 - F：測定工程）

反応チャンバ 7 に残された、抗原抗体複合体における標識物質 4 の量を測定する。当該測定は、図 2 に示す免疫学的測定法における工程 2 - D と同様にして実施すればよい。当該測定に使用する測定溶液は、工程 8 - B において保存した、試料溶液の他の一部 8 を溶媒に用いることにより得る。こうして、緩衝液を用いずに、試料溶液を溶媒として用いても、良好な測定を実施できる測定溶液が得られる。

30

## 【 0 0 4 0 】

（算出工程）

測定工程において測定された量（測定結果）に基づき、測定対象抗原の量を算出する。より具体的には、当該測定結果、反応チャンバ 7 に固定した固相抗体 1 9 の量、および結合工程（工程 8 - B）において反応チャンバ 7 に導入した試料溶液の一部 1 の量に基づき、測定対象抗原 2 の量を算出する。測定対象抗原の量とは、上記のとおり、当該量に関連付けられる物理量、例えば濃度であってよい。

## 【 0 0 4 1 】

本発明の免疫学的測定法は、測定溶液の溶媒として緩衝液を使用した場合に匹敵する程度に、測定対象物質の濃度を反映したシグナルを検出できる限り、操作および使用する器具を適宜変更してよい。例えば、図 2 および 8 に示す免疫学的測定法では、抗原抗体複合体または測定対象抗原と結合していない抗体を得るための一次抗体を標識物質で標識した場合について説明したが、これに代えて、図 3 の概念図に示すように、抗原抗体複合体または測定対象抗原と結合していない抗体を得るための一次抗体 2 2 は非標識とし、当該非標識の一次抗体 2 2 に結合させる二次抗体 1 8 を標識物質で標識してもよい。また、図 2 および 8 に示す免疫学的測定法では、分離工程後に反応チャンバ 7 に残された、抗原抗体複合体および測定対象抗原と結合していない抗体から選ばれる一方を対象として測定工程を実施する場合について説明したが、これに代えて、分離工程により反応チャンバ 7 から除去された他方を対象として測定工程を実施してもよい。また、本発明の免疫学的測定法

40

50

は、上記のとおり、チップ上での実施を容易にする観点から、反応チャンバとして、マイクロプレートに代表される、液体を保持可能な形状を有する基体を使用することが望ましいが、これに代えて、樹脂ビーズおよび磁性ビーズなどのビーズ体に代表される、液体の保持が容易でない形状を有する基体を使用することを排除しない。また、図2および8に示す免疫学的測定法では、試料溶液を分注し、反応チャンバにおいて抗原抗体反応を誘導するための溶液と、測定溶液を調製するための溶媒とを準備する場合について説明したが、これに代えて、試料溶液を新たに採取することにより測定溶液を調製するための溶媒を準備しても構わない。

【0042】

図4は、本発明の免疫学的測定法の実施に適したチップの一例について説明するための図である。

【0043】

チップ100は、チップ基板11と、当該基板11に形成された、反応チャンバ12、溶媒保持チャンバ14、廃液チャンバ15および試料溶液の注入孔17とを有する。チップ基板11の材質としては、PETに代表される、本発明の免疫学的測定法で使用する反応チャンバ7のための材質を例示できる。

【0044】

注入孔17と反応チャンバ12は、チップ基板11に形成された流路16aにより接続されている。また、注入孔17と溶媒保持チャンバ14は、チップ基板11に形成された流路16bにより接続されている。流路16aおよび流路16bは、互いに連通しない状態にある。このため、試料溶液を注入孔17に注入すると、当該試料溶液は、流路16aを

通って反応チャンバ12と、流路16bを

通って洗浄液保持チャンバ14とに分けられる。こうして、試料溶液の一部が反応チャンバ12に送られ、また、試料溶液の他の一部が溶媒保持チャンバ14に送られて当該チャンバ14に保持される。

【0045】

溶媒保持チャンバ14には、測定用試薬13が配置されている。測定用試薬13は、本発明の免疫学的測定方法の説明で述べたように、測定溶液中の抗原抗体複合体または測定対象抗原と結合していない抗体の量を測定するための試薬である。測定用試薬13は、溶媒保持チャンバ14に導入される溶媒に溶解できる状態で配置されている。このため、試料溶液の上記他の一部が溶媒保持チャンバ14に導入されると、当該溶媒保持チャンバ14において、試料溶液の上記他の一部に測定用試薬が添加された状態が形成される。測定用試薬13は、例えば、液状の試薬を溶媒保持チャンバ14に滴下し乾燥させることにより、溶媒に溶解できる状態で配置できる。測定用試薬13は、試料溶液の上記他の一部が溶媒保持チャンバ14に導入されるまでの経路上（例えば流路16b）に配置されていてもよい。また、溶媒保持チャンバ14から反応チャンバ12に導入されるまでの経路上に配置されていてもよい。例えば、測定用試薬13は、図5に示すチップ101のように、流路16cの一部を変形させて形成した測定用試薬保持チャンバ40に配置してもよい。

【0046】

反応チャンバ12には、(1)固相抗原、および(2)固相抗体、から選ばれるいずれか一方が固定されていることが望ましい。試料溶液の上記一部が反応チャンバ12に導入されるまでの経路上または反応チャンバ12の内部には、試料溶液中の測定対象抗原に特異的に結合する一次抗体が、当該試料溶液に溶解できる状態で配置されていることが望ましい。一次抗体は、標識物質により標識された状態にあることが好ましい。試料溶液の上記一部が反応チャンバ12に導入されると、(1)反応チャンバ12に固相抗原が固定されている場合は、測定対象抗原と抗体との結合体である、抗原抗体複合体と、固相抗原と抗体との結合体である、測定対象抗原と結合していない抗体とが得られ、(2)反応チャンバ12に固相抗体が固定されている場合は、固相抗体と測定対象抗原と抗体との結合体である、抗原抗体複合体と、抗体の残部である、測定対象抗原と結合していない抗体と、が得られる。

【0047】

反応チャンバ１２と廃液チャンバ１５は、チップ基板１１に形成された流路１６ｄにより接続されている。試料溶液の上記一部は、反応チャンバ１２における抗原抗体反応が定常状態に達した後、流路１６ｄを介して反応チャンバ１２から廃液チャンバ１５に送られる。これにより、抗原抗体複合体および測定対象抗原と結合していない抗体から選ばれる一方が反応チャンバ１２に残されるとともに、他方が廃液チャンバ１５に移動する。こうして、反応チャンバ１２に固相抗原が配置されている場合は測定対象抗原と結合していない抗体が、また、反応チャンバ１２に固相抗体が配置されている場合は抗原抗体複合体が、それぞれ反応チャンバ１２に残されて、抗原抗体複合体と、測定対象抗原と結合していない抗体と、が分離される。

【００４８】

10

このように、本発明のチップは、反応チャンバに固相抗原が固定されており、測定対象抗原と結合していない抗体が、固相抗原に結合した状態にあり、上記分離において、測定対象抗原と結合していない抗体が反応チャンバに残され、抗原抗体複合体が廃液チャンバに移動するようにしてよい。また、上述のように、本発明のチップは、反応チャンバに固相抗体が固定されており、抗原抗体複合体が、固相抗体と測定対象抗原と抗体との結合体であり、上記分離において、抗原抗体複合体が反応チャンバに残され、測定対象抗原と結合していない抗体が廃液チャンバに移動するようにしてもよい。

【００４９】

溶媒保持チャンバ１４に保持されている試料溶液（上記他の一部）は、上記分離の後で、流路１６ｃを介して、反応チャンバ１２に、測定用試薬１３と共に注入される。これにより、反応チャンバ１２において、反応チャンバ１２に残された抗原抗体複合体および測定対象抗原と結合していない抗体から選ばれる上記一方と、測定用試薬１３と、を含有する測定溶液が得られる。

20

【００５０】

それぞれの流路を介した送液は、電気浸透流を利用する方法（例えば、Barkerら、Anal.Chem.;(Article);2000;72(24);5925-5929）、ポンプによる噴射力または吸引力を利用する方法（例えば、Hisamotoら、Anal.Chem.;(Article);2001;73(22);5551-5556）、遠心力を利用する方法（例えば、Duffyら、Anal.Chem.;(Article);1999;71(24);4669-4678）などの公知の送液方法により実施すればよい。

【００５１】

30

以上のように、本発明のチップによれば、試料溶液を溶媒として活用することにより、緩衝液を使用せずに測定溶液を得ることができる。本発明の免疫学的測定方法の説明で述べたように、こうして得た測定溶液により、緩衝液を使用した場合に匹敵する精度で、測定対象物質の濃度を反映したシグナルを検出できる。シグナルの検出は、反応チャンバ１２に残された上記一方を対象として実施してもよいし、廃液チャンバ１５に移動させた上記他方を対象として実施してもよい。廃液チャンバ１５に移動させた上記他方を対象として、測定工程を実施する場合は、試料溶液の上記他の一部を、反応チャンバ１２に留めず、さらに廃液チャンバ１５へと送ることにより、廃液チャンバ１５において測定溶液を得ればよい。このように廃液チャンバは、廃液の貯蔵以外に、酵素反応の実施にも使用でき、用語「廃液」によってその用途は限定されない。

40

【００５２】

本発明のチップは、緩衝液を使用した場合に匹敵する程度に良好な測定を実施できる限り、その設計を適宜変更してよい。例えば、抗原抗体反応をサンドイッチ法により実施できるように、標識された抗体を反応チャンバに導入するための流路を別途形成してよい。また、例えば、図６に示すように、廃液チャンバ１５のみにて測定工程を実施するチップ１０２としてもよい。チップ１０２は、流路１６ｃに代えて、溶媒保持チャンバ１４と廃液チャンバ１５とを導通させる流路１６ｅがチップ基板１１に形成されていること以外は、チップ１００と同様に形成されている。チップ１０２では、試料溶液の上記他の一部が、反応チャンバ１２を経由せずに、流路１６ｅを介して、溶媒保持チャンバ１４から廃液チャンバ１５に、測定用試薬１３と共に注入される。チップ１０２では、流路１６ｂ

50

、溶媒保持チャンバ14および流路16eを経由する、注入孔17から廃液チャンバ15までの経路上であれば、測定用試薬13をどこに配置してもよい。

【0053】

以下、実施例により、本発明をさらに詳細に説明する。

【0054】

(参考例)

まず、緩衝液を溶媒とする測定溶液を使用することにより、免疫学的測定を実施した、参考例について説明する。

【0055】

[反応チャンバの作製]

厚さ1mmのPET板にφ5mmの孔を複数個形成した。その後、当該孔の一方の端部を覆うように、当該PET板の片面上に、別のPET板を、公知の光硬化型接着剤(ラックストラック)を用いて貼り付けた。こうして反応チャンバを複数個作製した。

【0056】

[CRPの固定化]

50mMのTris-HClバッファー(pH7.5)を用い、42.3nMのCRP溶液を調製した。当該CRP溶液を、それぞれの反応チャンバに10μLずつ導入した。続いて、それぞれの反応チャンバを樹脂シート(96穴用シート)でシールし、35℃で1時間保持することにより、反応チャンバにCRPを吸着させた。その後、反応チャンバを、50mMのTris-HClバッファー(pH7.5)を用いて洗浄した。次に、ブロッキング剤(生化学工業社製ApplieDuo, CatNo.200140)を、それぞれの反応チャンバに10μLずつ加え、35℃で1時間保持した。こうして、吸着させたCRPをブロッキングし、反応チャンバに固相抗原を形成した。その後、反応チャンバを、50mMのTris-HClバッファー(pH7.5)を用いて再度洗浄した。

【0057】

[抗原抗体反応]

CRPを血清(シノテスト社製、ヒトコントロール血清)に添加することにより、0nM、3.8nM、6.3nM、9.5nMおよび19nMのCRP濃度の試料溶液を調製した。反応チャンバに、アルカリホスファターゼ(ALP)により標識された88nMの抗CRPモノクローナル抗体と、試料溶液とを導入し、35℃で15分間保持した。こうして固相抗原およびCRPと、抗体との間で抗原抗体反応を進行させた。

【0058】

[分離]

50mMのTris-HClバッファー(pH7.5)10μLを、反応チャンバに導入し、除去した。これにより、CRPと抗体との結合体である、抗原抗体複合体と、固相抗原と抗体との結合体である、測定対象抗原と結合していない抗体と、を分離した。より具体的には、抗原抗体複合体を反応チャンバから除去するとともに、測定対象抗原と結合していない抗体を反応チャンバに残した。

【0059】

[測定]

それぞれの反応チャンバにp-ニトロフェニルリン酸溶液(Cygnus社製PNPP Liquid Substrate, CatNo.F008-1000; pNPP)10μLを導入することにより、反応チャンバにおいて測定溶液を得た。測定溶液中で、測定対象抗原と結合していない抗体におけるALPと、pNPPとの間の酵素反応を進行させた後、当該酵素反応の生成物であるp-ニトロフェノール(pNP)の吸光度を、それぞれの反応チャンバから測定した。

【0060】

(実施例)

pNPPに代えて、試料溶液を溶媒として得た測定溶液を用い、吸光度測定に代えて、電気化学的測定手段を用いて酵素反応の生成物の量を測定したこと以外は、参考例と同様にして免疫学的測定を実施した。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 1 】

溶媒として用いた試料溶液は、抗原抗体反応を誘導するための試料溶液の一部を分注することにより準備した。

## 【 0 0 6 2 】

測定用試薬は、フェリシアン化カリウム、ジアホラーゼ、NADP、リンゴ酸デヒドロゲナーゼおよびリンゴ酸ナトリウムからなる酵素サイクリング反应用試薬を用いた。

## 【 0 0 6 3 】

酵素反応は、測定用試薬を添加した状態にある試料溶液の上記一部 10  $\mu$ L を反応チャンバに導入して測定溶液を得た後、反応チャンバ中で測定溶液を 7.5 分間保持することにより進行させた。酵素反応の生成物の量は、反応チャンバ中の測定溶液に電極群を浸し、400 mV の電圧を印加し、発生した電流値を計測することにより測定した。

10

## 【 0 0 6 4 】

図 7 は、参考例および実施例から得た測定結果を示すグラフである。吸光度は、495 nm の測定で得られた値である。図 7 に示すように、いずれの例においても、試料溶液中の CRP 濃度の相違を反映した吸光度および電流値が測定された。これにより、測定溶液の溶媒として試料溶液を使用しても、緩衝液を使用した場合に匹敵する精度で、免疫学的測定を実施できることがわかった。

## 【 産業上の利用可能性 】

## 【 0 0 6 5 】

本発明は、測定対象物質の量を反映したシグナルを検出するための測定溶液を、緩衝液を使用せずに得られる免疫学的測定法を提供するものとして、チップ上での免疫学的測定法の実施が要求される各分野において多大な利用価値を有する。

20

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 6 6 】

【 図 1 】 図 1 は、従来の免疫学的測定法の一例について説明するための工程図である。

【 図 2 】 図 2 は、本発明の免疫学的測定法の一例について説明するための工程図である。

【 図 3 】 図 3 は、本発明の免疫学的測定法を、非標識の一次抗体および標識された二次抗体を用いて実施する場合の一例について説明するための図である。

【 図 4 】 図 4 は、本発明のチップの一例について説明するための図である。

【 図 5 】 図 5 は、本発明のチップの別例について説明するための図である。

30

【 図 6 】 図 6 は、本発明のチップの別例について説明するための図である。

【 図 7 】 図 7 は、実施例および参考例の実験結果を示すグラフである。

【 図 8 】 図 8 は、抗体と測定対象抗原との抗原抗体反応を、サンドイッチ法により実施する場合の一例について説明するための工程図である。

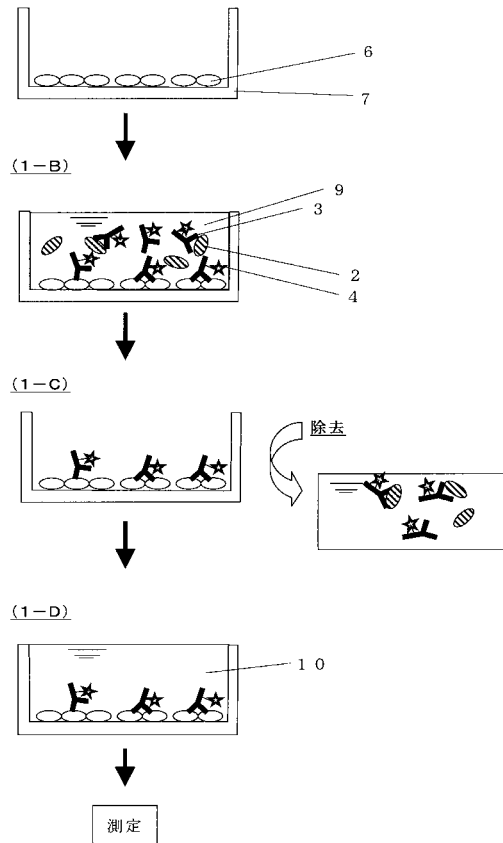
## 【 要約 】

本発明は、チップ上での実施に適した免疫学的測定法を提供する。反応チャンバ 7 において測定対象抗原 2 と抗体 3 とが結合した状態にある抗原抗体複合体を得た後、試料溶液 8 を溶媒として用いることにより得た測定溶液を使用して、抗原抗体複合体、または測定対象抗原に結合していない抗体の量を測定する、免疫学的測定法とする。本発明によれば、測定対象抗原の量を反映したシグナルを検出するための測定溶液を、タンパク質などの測定対象物質を含有しない、緩衝液を使用せずに得ることができる。これにより、緩衝液をチップの外部から供給したりチップ上に予め保持させたりする必要がなくなるため、チップ上で容易に免疫学的測定法を実施できる。

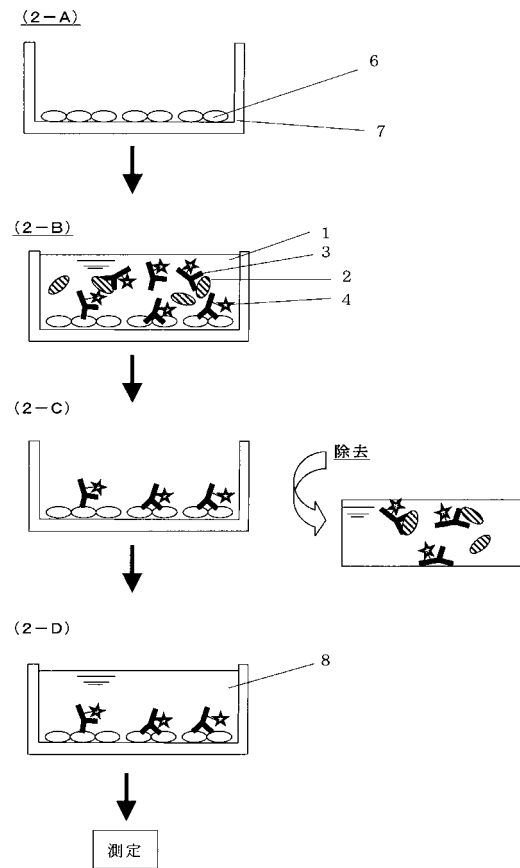
40

## 【 選択図 】 図 2

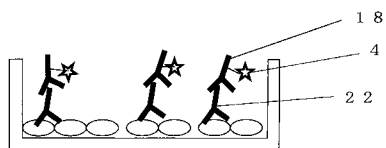
【図 1】



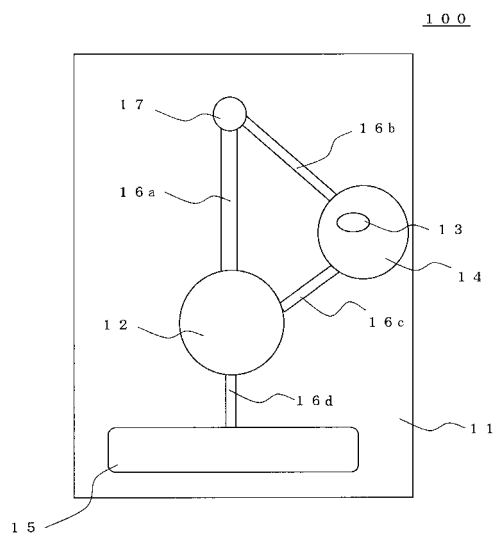
【図 2】



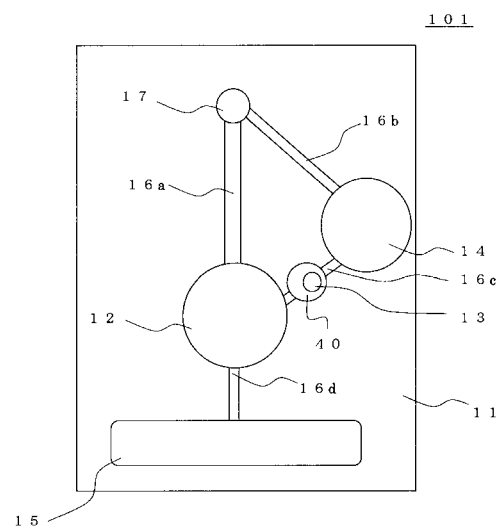
【図 3】



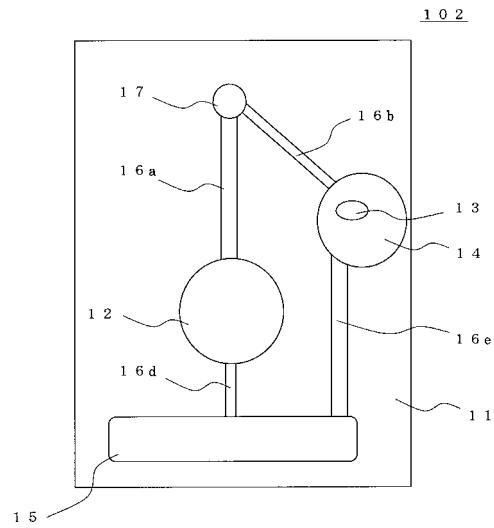
【図 4】



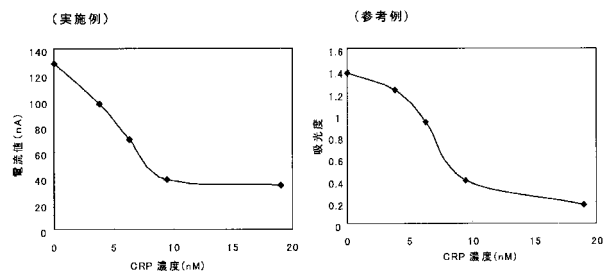
【図 5】



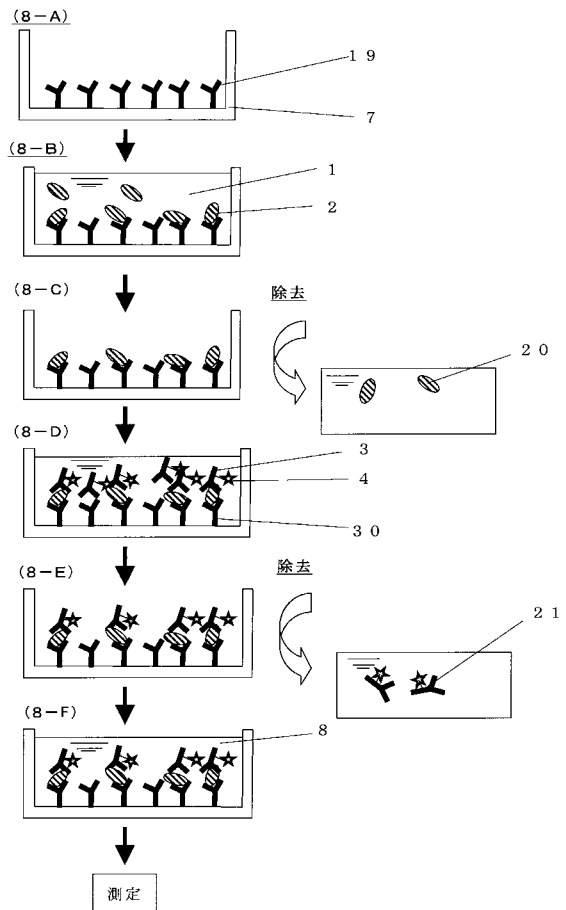
【図 6】



【図 7】



【図 8】



---

フロントページの続き

(56)参考文献 特開 2 0 0 1 - 0 0 4 6 2 8 ( J P , A )  
特開 2 0 0 5 - 5 0 9 1 5 8 ( J P , A )  
特開 2 0 0 3 - 1 1 4 2 2 9 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/53

G01N 33/536

G01N 33/543

G01N 37/00

|               |                                                                                                                          |         |            |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)       | 免疫学测量方法和芯片                                                                                                               |         |            |
| 公开(公告)号       | <a href="#">JP4044130B2</a>                                                                                              | 公开(公告)日 | 2008-02-06 |
| 申请号           | JP2007532714                                                                                                             | 申请日     | 2007-04-09 |
| 申请(专利权)人(译)   | 松下电器产业株式会社                                                                                                               |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译) | 松下电器产业有限公司                                                                                                               |         |            |
| [标]发明人        | 畠岡由香利                                                                                                                    |         |            |
| 发明人           | 畠岡 由香利                                                                                                                   |         |            |
| IPC分类号        | G01N33/53 G01N33/536 G01N33/543 G01N37/00                                                                                |         |            |
| CPC分类号        | G01N33/54366 B01L3/5027 B01L3/502753 B01L2200/0621 B01L2300/0816 B01L2300/0864 B01L2400/0409 B01L2400/0418 B01L2400/0487 |         |            |
| FI分类号         | G01N33/53.D G01N33/536.A G01N33/543.501 G01N37/00.101                                                                    |         |            |
| 代理人(译)        | 蒲田浩一                                                                                                                     |         |            |
| 审查员(译)        | 白形 由美子                                                                                                                   |         |            |
| 优先权           | 2006149733 2006-05-30 JP                                                                                                 |         |            |
| 其他公开文献        | JPWO2007138789A1                                                                                                         |         |            |
| 外部链接          | <a href="#">Espacenet</a>                                                                                                |         |            |

#### 摘要(译)

本发明提供适合在芯片上实施的免疫测定。在将测定对象抗原2和抗体3结合在反应室7中的状态下获得抗原-抗体复合物之后，使用以样品溶液8作为溶剂获得的测定溶液，然后，抗原-抗体复合物，可替代地，使用免疫学测量方法，其中测量尚未与待测量抗原结合的抗体的量。根据本发明，无需使用不包含蛋白质等被测定物质的缓冲溶液，就可以得到用于检测反映被测定抗原量的信号的测定溶液。这消除了从芯片外部提供缓冲溶液或将其预先保持在芯片上的需要，从而可以在芯片上容易地进行免疫学测定方法。[选择图]图2

【 图 5 】

