

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2007/138789

発行日 平成21年10月1日(2009.10.1)

(43) 国際公開日 平成19年12月6日(2007.12.6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 35/08 (2006.01)	GO 1 N 35/08 A	2 G O 5 8
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 T	
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 O 1	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 36 頁)

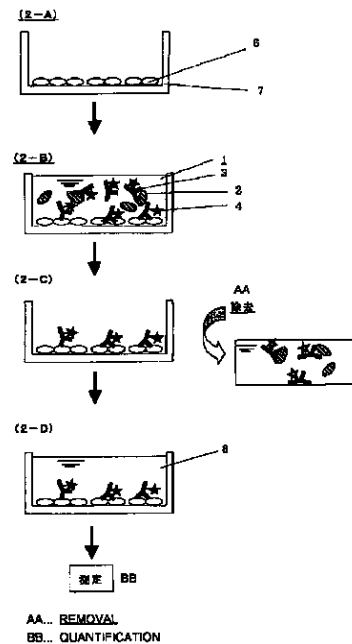
出願番号	特願2007-532714 (P2007-532714)	(71) 出願人	000005821
(21) 国際出願番号	PCT/JP2007/057830		パナソニック株式会社
(22) 国際出願日	平成19年4月9日(2007.4.9)		大阪府門真市大字門真1006番地
(11) 特許番号	特許第4044130号 (P4044130)	(74) 代理人	100107641
(45) 特許公報発行日	平成20年2月6日(2008.2.6)		弁理士 鎌田 耕一
(31) 優先権主張番号	特願2006-149733 (P2006-149733)	(72) 発明者	島岡 由香利
(32) 優先日	平成18年5月30日(2006.5.30)		大阪府門真市大字門真1006番地 松下
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		電器産業株式会社内
		Fターム(参考)	2G058 AA09 DA07

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) 【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。



【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、

10

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

i i) 前記測定対象抗原と結合していない抗体、

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、

30

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】

40

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、

50

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

i i) 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。

【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。

【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、

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

10

20

30

40

50

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。

【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、

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、

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 流路を通過して前記測定用試薬と共に注入される、

チップ。

【請求項 11】

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 10 に記載のチップ。

【請求項 12】

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 10 に記載のチップ。

【請求項 13】

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、

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

i i) 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流路を經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14】

10

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13に記載のチップ。

【請求項15】

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13に記載のチップ。

【発明の詳細な説明】

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

反応には関与しないタンパク質で覆う（ブロッキング）。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。

【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。

【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

10

20

30

40

50

成することは容易ではない。

【発明の開示】

【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。

【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 i i) 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、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 i i) 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 流路を通過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。

【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、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 i i) 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。

【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。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【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。

10

【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。

【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。

【発明を実施するための最良の形態】

20

【0022】

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。

【0023】

（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。

【0024】

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。

30

【0025】

（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、クレアチニンキナーゼ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。

40

【0026】

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

50

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。

【0027】

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。

【0028】

(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。

【0029】

(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、測定用試薬を含有する溶液を調製する。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-ニトロフェニリン酸(pNPP)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。

【0030】

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。

【0031】

(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。

【0032】

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。

【0033】

（工程8-A：固相抗体の形成）

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19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と同様にして行えばよい。

【0034】

（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。

【0035】

試料溶液の一部1を、固相抗体19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19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19との結合体が形成される。

【0036】

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19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19との結合体が反応チャンバ7に残される。固相抗体19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。

【0037】

その後、溶液30を反応チャンバ7に導入する。溶液30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19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30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30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19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19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21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21は、反応チャンバ7の表面から遊離した状態で、溶液30中に存在する。

【0038】

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。

【0039】

10

20

30

40

50

(工程 8－E：分離工程)

溶液 30 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。

【0040】

(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。

【0041】

(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 19 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。

【0042】

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 22 は非標識とし、当該非標識の一次抗体 22 に結合させる二次抗体 18 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。

【0043】

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。

【0044】

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。

【0045】

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を通過して反応チャンバ12と、流路16bを通過し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。

【0046】

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。

【0047】

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。

【0048】

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。

【0049】

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。

【0050】

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。

【0051】

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。

10

【0052】

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。

20

【0053】

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のみにおい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、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。

30

【0054】

以下、実施例により、本発明をさらに詳細に説明する。

【0055】

（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。

40

【0056】

〔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。

【0057】

〔CRPの固定化〕

50mMのTris-HClバッファ（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。

50

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Applied Duo, Cat No. 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。

【0058】

〔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。

【0059】

〔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。

【0060】

〔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, Cat No. 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。

【0061】

（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。

【0062】

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。

【0063】

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。

【0064】

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10μL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、400mV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。

【0065】

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、495nm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

10

20

30

40

50

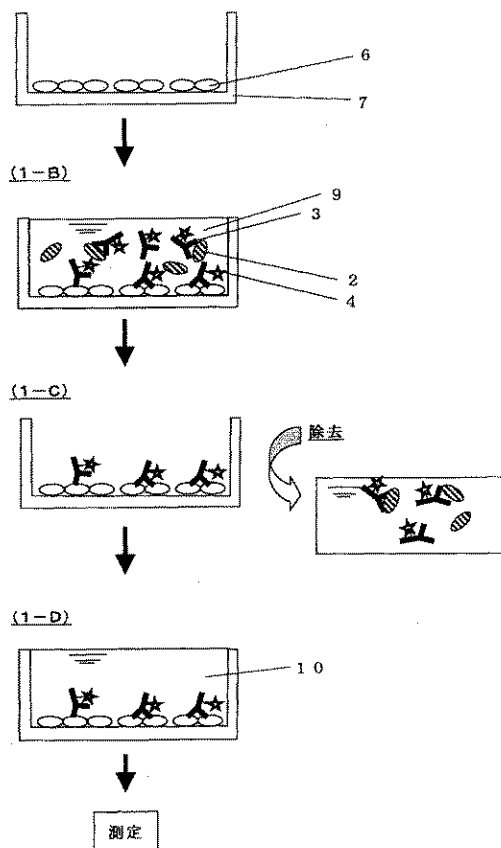
測定を実施できることがわかった。

【産業上の利用可能性】

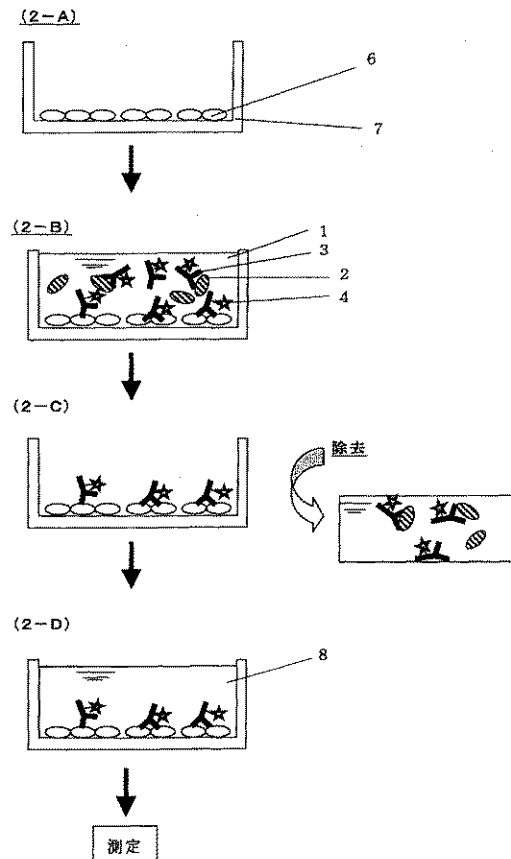
【0066】

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。

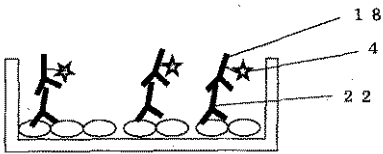
【図 1】



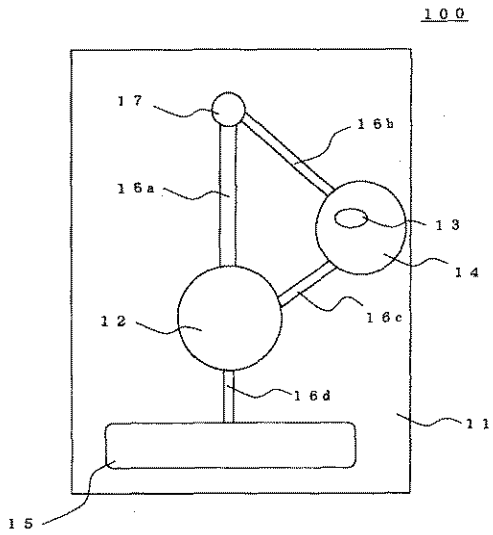
【図 2】



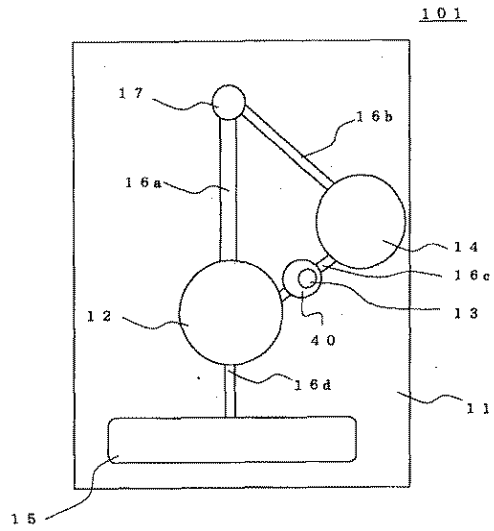
【図 3】



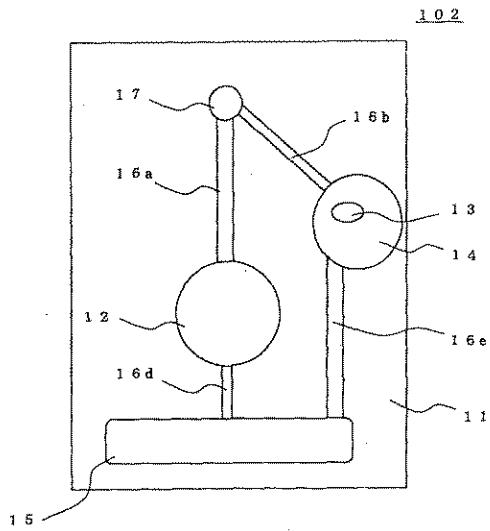
【図 4】



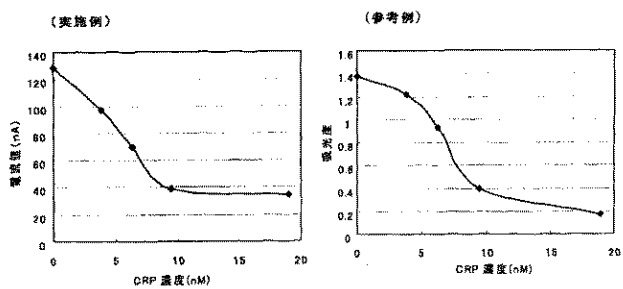
【図 5】



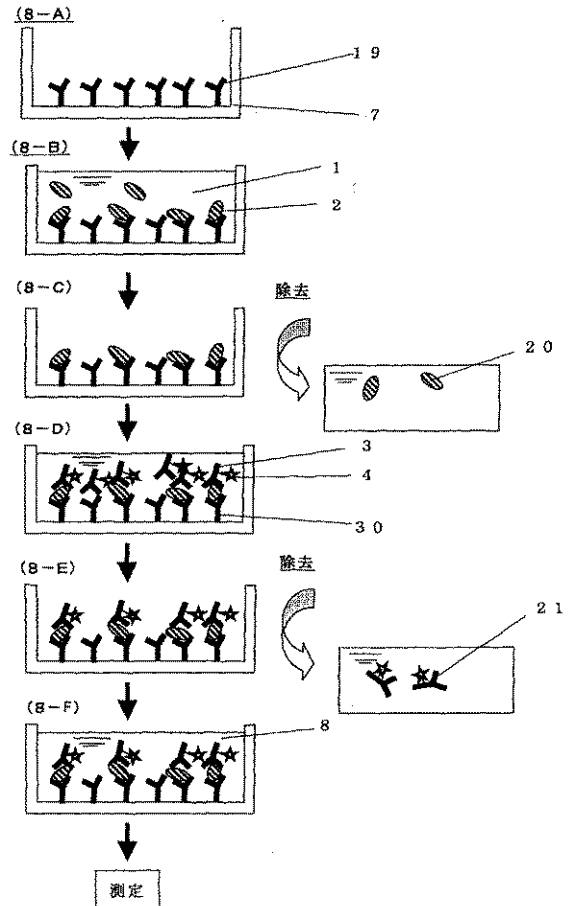
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【手続補正書】

【提出日】平成19年7月10日(2007.7.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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、

10

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、

20

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、

30

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、

40

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

50

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、

10

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、

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。

30

【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。

40

【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、

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

50

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。

【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、

10

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、

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、

20

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、

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 流路を通過して前記測定用試薬と共に注入される、

30

チップ。

【請求項 11】

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 10 に記載のチップ。

【請求項 12】

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 10 に記載のチップ。

40

【請求項 13】

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、

50

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、

10

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14】

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13に記載のチップ。

20

【請求項15】

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13に記載のチップ。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【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。

40

【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質量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

50

(E I A)、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。E I A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。

【0005】

代表的なE I Aとしては、固相酵素免疫検定法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ; E L I S A) が例示できる。E L I S A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 (ブロッキング)。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。

【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。

【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。

10

【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】

20

【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。

30

40

【0016】

50

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。

10

20

【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。

30

【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。

40

【0019】

50

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きともに、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。

10

【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。

20

【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。

【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と同様に行えばよい。

【0023】

30

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、クレアチニンキナーゼ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。

40

【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

50

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、を得るようによりよい。

【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。

【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。

【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、測定用試薬を含有する溶液を調製する。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-ニトロフェニルリン酸（pNPP）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を検出する。

【0029】

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。

【0030】

（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。

【0031】

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。

10

【0032】

（工程8-A：固相抗体の形成）

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19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と同様にして行えばよい。

【0033】

（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。

【0034】

試料溶液の一部1を、固相抗体19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19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19との結合体が形成される。

20

【0035】

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19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19との結合体が反応チャンバ7に残される。固相抗体19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バッファー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。

30

【0036】

その後、溶液30を反応チャンバ7に導入する。溶液30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19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30の溶媒としては、Tris-HClバッファーを例示できる。導入した溶液30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19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19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21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21は、反応チャンバ7の表面から遊離した状態で、溶液30中に存在する。

40

【0037】

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。

50

【0038】

(工程8-E:分離工程)

溶液30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。

【0039】

(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。

【0040】

(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19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。

【0041】

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22は非標識とし、当該非標識の一次抗体22に結合させる二次抗体18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 16 b により接続されている。流路 16 a および流路 16 b 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 16 a を通って反応チャンバ 12 と、流路 16 b 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 16 b）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 16 c 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 16 d 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 16 d 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】

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。

【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。

10

【0051】

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。

20

【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のみにおい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、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。

30

【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。

40

【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（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

50

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、50 mM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10 μ Lずつ加え、35 $^{\circ}$ C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、50 mM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、0 nM、3.8 nM、6.3 nM、9.5 nMおよび19 nM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88 nMの抗CRPモノクローナル抗体と、試料溶液とを導入し、35 $^{\circ}$ C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]

50 mMのTris-HClバッファー (pH7.5) 10 μ L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) 10 μ L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。

【0061】

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。

【0062】

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応用試薬を用いた。

【0063】

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 μ 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。

【0064】

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】

10

20

30

40

50

【0065】

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。

【図面の簡単な説明】

【0066】

【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。

10

【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。

【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。

【手続補正3】

【補正対象書類名】図面

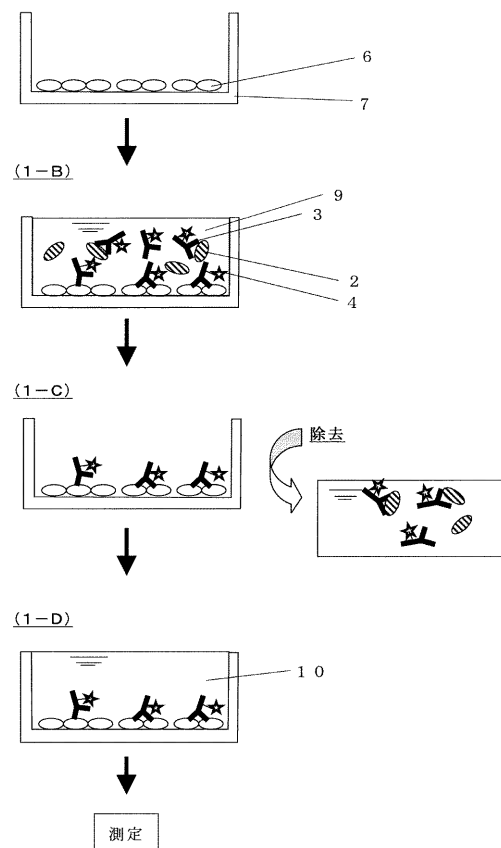
【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

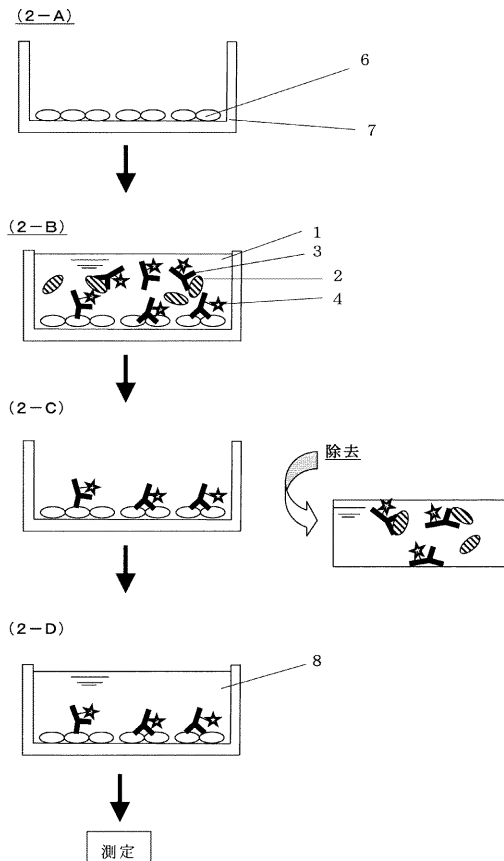
20

【補正の内容】

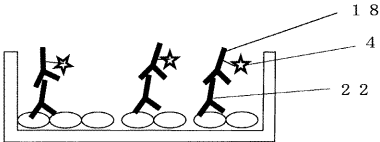
【図1】



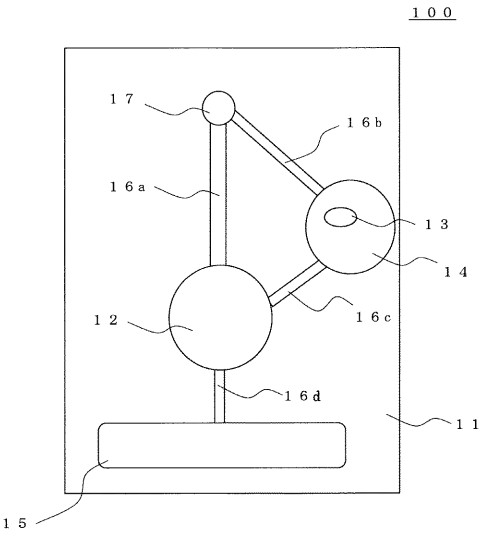
【図2】



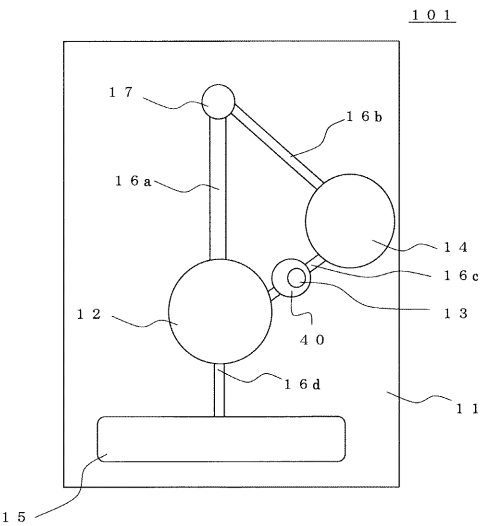
【図 3】



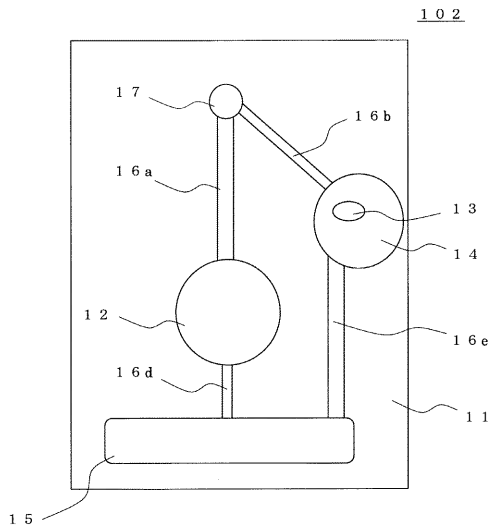
【図 4】



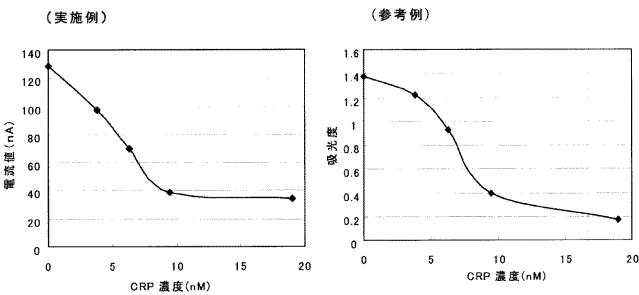
【図 5】



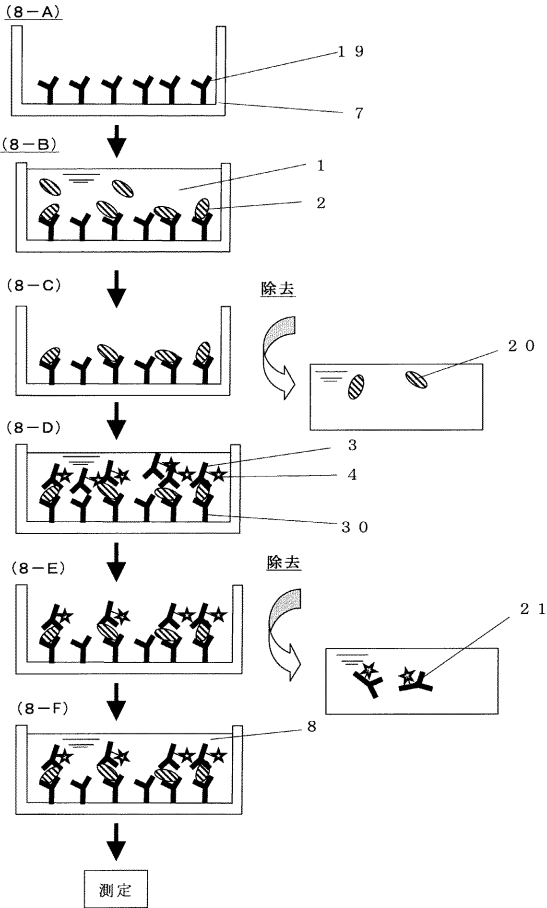
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/057830

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/53(2006.01) i, G01N33/536(2006.01) i, G01N33/543(2006.01) i,
G01N37/00(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)
G01N33/53, G01N33/536, G01N33/543, G01N37/00

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 2001-004628 A (Kanagawa Academy of Science and Technology), 12 January, 2001 (12.01.01), (Family: none)	1-15
A	JP 2005-509158 A (Prolight Diagnostics AB.), 07 April, 2005 (07.04.05), & US 2003/0087325 A1 & EP 1451582 A1 & WO 2003/040721 A1	1-15
A	JP 2003-114229 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 18 April, 2003 (18.04.03), (Family: none)	1-15

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 April, 2007 (27.04.07)Date of mailing of the international search report
15 May, 2007 (15.05.07)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 5 7 8 3 0	
A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, G01N33/536(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N37/00(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（I P C）） Int.Cl. G01N33/53, G01N33/536, G01N33/543, G01N37/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 2 0 0 7 年 日本国実用新案登録公報 1 9 9 6 - 2 0 0 7 年 日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 2 0 0 7 年			
国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に利用した用語）			
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 2001-004628 A（財団法人神奈川科学技術アカデミー）2001.01.12 （ファミリーなし）	1 - 1 5	
A	JP 2005-509158 A（プロライト ダイアグノースティクス アクチ ボラゲット）2005.04.07 & US 2003/0087325 A1 & EP 1451582 A1 & WO 2003/040721 A1	1 - 1 5	
A	JP 2003-114229 A（三菱化学株式会社）2003.04.18 （ファミリーなし）	1 - 1 5	
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 2 7 . 0 4 . 2 0 0 7		国際調査報告の発送日 1 5 . 0 5 . 2 0 0 7	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / 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） 白形 由美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

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,MT,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,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,
CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,K
R,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD
,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(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

(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)	免疫学测量方法和芯片		
公开(公告)号	JPWO2007138789A1	公开(公告)日	2009-10-01
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		
[标]发明人	畠岡由香利		
发明人	畠岡 由香利		
IPC分类号	G01N35/08 G01N33/53 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	G01N35/08.A G01N33/53.T G01N37/00.101		
F-TERM分类号	2G058/AA09 2G058/DA07		
代理人(译)	蒲田浩一		
优先权	2006149733 2006-05-30 JP		
其他公开文献	JP4044130B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了适合在芯片上进行的免疫学测定。在反应室7中获得待测抗原2和抗体3彼此结合的抗原-抗体复合物后，未与抗原结合的抗原-抗体复合物或抗体的量达到 通过使用通过使用样品溶液8作为溶剂而获得的测量溶液来测量样品的浓度。根据本发明，无需使用没有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物质的量的信号的测定溶液。因此，不必从芯片外部提供缓冲溶液，也不必事先将缓冲溶液保留在芯片上。因此，可以容易地在芯片上进行免疫学测定。

