

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3581360号
(P3581360)

(45) 発行日 平成16年10月27日(2004.10.27)

(24) 登録日 平成16年7月30日(2004.7.30)

(51) Int.Cl.⁷

F I

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

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

請求項の数 9 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2002-358188 (P2002-358188)	(73) 特許権者	502358418
(22) 出願日	平成14年12月10日 (2002.12.10)		株式会社生理科学研究所
(65) 公開番号	特開2004-191129 (P2004-191129A)		東京都品川区上大崎3-14-37 パル
(43) 公開日	平成16年7月8日 (2004.7.8)		チックストーンビル2階
審査請求日	平成16年3月2日 (2004.3.2)	(74) 代理人	100091096
早期審査対象出願			弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫
		(72) 発明者	孤田 二一
			埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 埼玉
			医科大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体または抗原を用いた病態解析チップおよびその利用法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

2種類以上の抗原または抗体が基板上に固定化された病態解析チップであって、抗体または抗原を固定化した側をさらに血液中不溶物除去フィルターで覆った病態解析チップ。

【請求項2】

血液中不溶物除去フィルターが透析膜である請求項1記載の病態解析チップ。

【請求項3】

肝機能検査項目、感染症検査項目、脂質系検査項目、尿酸検査項目、腎機能検査項目、膵機能検査項目、血清学検査、腫瘍マーカー検査項目、甲状腺検査項目、アレルギー検査項目、血清蛋白分画検査項目および出血凝固検査項目を測定するための各検査項目に対して少なくとも1種類の抗原または抗体が基板上に固定化された請求項1または2に記載の病態解析チップ。

【請求項4】

アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、GTP、アルカリフォスファターゼ、総ビリルビン、アルブミン、コリンエステラーゼ、乳酸脱水素酵素、アルカリフォスファターゼ (ALP)、総コレステロール、中性脂肪、尿酸、C-反応性タンパク質、クレアチニンキナーゼ、CK-MB、直接ビリルビン (D.B IL)、アルブミン：グロブリン比、梅毒定性、HBs抗原、HCV抗体、トロポニンT、Dダイマ一定性、血液型、ヘモグロビン、フィラデルフィア染色体、ビタミンB12、ミオシン軽鎖、アルドステロン濃度、レニン活性及びHbA1cからなる検査項目の少なくとも2項目を測

定し得る、該項目を免疫学的に測定するための抗体または抗原が基板上に固定化された請求項 1 または 2 に記載の病態解析チップ。

【請求項 5】

アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、GTP、アルカリフォスファターゼ、総ビリルビン、アルブミン、コリンエステラーゼ、乳酸脱水素酵素、アルカリフォスファターゼ (ALP)、総コレステロール、中性脂肪、尿酸、C-反応性タンパク質、クレアチニンキナーゼ、CK-MB、直接ビリルビン (D.BIL)、アルブミン：グロブリン比、梅毒定性、HBs抗原、HCV抗体、トロポニンT、Dダイマー定性、血液型、ヘモグロビン、フィラデルフィア染色体、ビタミンB12、ミオシン軽鎖、アルドステロン濃度、レニン活性及びHbA1cからなる30の検査項目のうち少なくとも20以上を同時に測定し得る、該項目を免疫学的に測定するための抗体または抗原が基板上に固定化された請求項 1 または 2 に記載の病態解析チップ。

10

【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の病態解析チップおよび蛍光色素で標識された検査項目を免疫学的に測定するための抗体または抗原を用いて病態を解析する方法。

【請求項 7】

請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の病態解析チップおよび蛍光色素で標識された検査項目を免疫学的に測定するための抗体または抗原を含む病態解析用キット。

【請求項 8】

請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の病態解析チップおよび簡易採血デバイスを含む病態解析用キット。

20

【請求項 9】

請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の病態解析チップを血液検査を受けようとする被験者に渡し、被験者の血液を塗布した病態解析チップを回収し、該病態解析チップを用いて検査項目を測定することを含む病態解析チップを用いて病態を解析する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、基板上に複数の抗体および/またはタンパク質が固定化された病態解析チップに関する。

30

【0002】

【従来の技術】

従来より、疾患の診断のために、抗原抗体反応を利用して血液等の生体試料中の抗原または抗体を疾患のマーカーとして定量的にまたは定性的に検出することが行われており、検出はRIA、IRMA、ELISA、EIA、イムノクロマトグラフィー等の手法を用いて行われている。例えば、ELISAにおいては検出しようとする生体試料中の抗原または抗体に特異的に結合する抗体または抗原を96ウェルのマイクロタイタープレートのウェル中に結合させ、各ウェルに血液、髄液、腹水液、唾液、尿などの生体試料を添加し、ウェルに結合させた抗原または抗体と生体試料中の抗体または抗原を結合させ、さらに酵素で標識した第2抗体を添加しウェル中の抗体-抗原結合物に結合させ発色させることにより、生体試料中の抗原または抗体を検出する。このような従来の方法においては、血液試料中の抗原又は抗体を測定しようとする場合、1回の測定当たり数十μLから数百μLの血液試料を必要とする。またほとんどの場合、抗原抗体反応に血球等が干渉物質として作用するため、採取した血液から血球等を分離し、血清または血漿として用いなければならなかった。特に一般の健康診断において、一度に複数の項目について診断を行うため、ある程度まとまった量の血液を要し、さらにそれについて血球分離処理等を行うため、10mL近い血液を採取する必要があるため、健康診断を受けようとする者は、病院等の検査機関まで行き採血してもらわなければならなかった。さらに、近年抗原抗体反応を利用した測定のはほとんどは自動化された大型の分析機器が必要であり、小病院、開業医等ではこれらの分析機器を導入することは困難であり、採取した血液を検査センター等に送付し測定

40

50

を行っているため、迅速に検査結果を入手できず、患者への対応も遅れるという不具合もあった。

【0003】

一方、近年スライドガラス等の基板上に多種類のDNAをスポッティング等により固定化し、または基板上で多種類のDNAを合成することにより、一枚の基板上に大量のDNAが固定化されたDNAマイクロアレイまたはDNAチップが作製されている(Fodor SP et al., Science 251:767-773, 1991; Schana M et al., Science 270:467-470, 1995)。このDNAマイクロアレイまたはDNAチップは遺伝子解析、SNP(一塩基多型)の解析、病態診断等に利用されている。DNAマイクロアレイまたはDNAチップは一度に多数のDNAを極めて高密度で集約して固定化することができる。従って例えば、精神疾患に關与する多数の精神病マーカー遺伝子をDNAマイクロアレイまたはDNAチップに固定化させておき、そこに被検体から採取した生体試料を添加し、生体試料中の核酸とDNAマイクロアレイまたはDNAチップ上のDNAとをハイブリダイズさせることにより、生体試料中の遺伝子を解析し被検体の精神疾患に關する病態を解析することができる。この際、DNAは基板上に極めて高密度で結合しているため、用いる生体試料の量もわずかで足りる。

10

【0004】

最近になって、抗体またはタンパク質を基板上に固定化して抗体またはタンパク質を一次担体とする分析用チップの開発も進められている。抗体およびタンパク質チップとしては、主として研究レベルでアポトーシス、プロテオーム解析に利用されている(小嶋謙一他、化学センサー研究会、17、106、2001)。また、ごく最近になってアレルギー疾患におけるIgGの定量(Kim. T.E. et al., Exp. Mol. Med, 31, 152, 2002)、心疾患におけるCRPやインターロイキン-6の定量としてその臨床応用の可能性が指摘されるようになった(Christodoulides, N. et al., Anal. Chem. 74, 3030, 2002)。

20

【0005】

【非特許文献1】

Fodor SP et al., Science 251:767-773, 1991

30

【非特許文献2】

Schana M et al., Science 270:467-470, 1995

【非特許文献3】

小嶋謙一他、化学センサー研究会、17、106、2001

【非特許文献4】

Kim. T.E. et al., Exp. Mol. Med, 31, 152, 2002

【非特許文献5】

Christodoulides, N. et al., Anal. Chem. 74, 3030, 2002

40

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、被験体の病態を解析するための、多項目の測定に対応すべく多種類の抗体または抗原タンパク質を固定化した病態解析チップの提供を目的とする。本発明は、さらに各病態解析チップを用いた病態解析方法の提供を目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

上述のように、抗体またはタンパク質を1次担体とするチップについて検討はされている

50

ものの、種々の項目を同時に測定できるチップについては、検討されていなかった。本発明者等は、抗体またはタンパク質を1次担体とするチップについてさらに鋭意検討を行い、臨床診断の迅速化と診断にかかる人件費や大型分析機導入にかかる経費の削減を可能にする各種疾患に適した病態解析（健康診断における基本検査、緊急検査、胃潰瘍十二指腸潰瘍検査、心筋梗塞検査、本態性高血圧症検査、糖尿病検査、肝炎検査、腫瘍マーカー、感染症検査、アレルギー検査検査など）チップの開発を試み、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

【0008】

抗体チップ用スライドガラス（クロンテック社）に上記各種疾患に対する抗体又は抗原を、ガラスチップ上に0.1～0.2μl塗布し、ブロックエース（大日本製薬）にて、抗体又は抗原が付着した以外の部位をブロックする。適当な洗浄液で、数回洗って乾燥させることにより、病態解析チップが完成する。次に検査時に病態解析チップ上の各スポットごとに0.1μlあるいは検査項目のレーンに連続して採取した生体サンプルを10μl～50μl塗布する。3～5分間反応後、適当な洗浄液でスライドガラスを洗い、次にフルオレセインで標識した二次抗体を0.1μl～0.3μl塗布し、洗浄後、スライドガラス上の蛍光強度をスキャナーでコンピューターに取り込み、各スポットの蛍光強度から、各種疾患の病態解析又は診断の補助とする。

【0009】

本発明は以下の態様の発明を含む。

(1) 2種類以上の抗原または抗体がスライドガラス基板上に固定化された病態解析チップ、

(2) 肝機能検査項目、B型肝炎ウイルス検査項目、C型肝炎ウイルス検査項目、脂質系検査項目、尿酸検査項目、腎機能検査項目、膵機能検査項目、血清学検査、腫瘍マーカー検査項目、甲状腺検査項目、血清蛋白分画検査項目および出血凝固検査項目を測定するための各検査項目に対して少なくとも1種類の抗原または抗体がスライドガラス基板上に固定化された病態解析チップ、

(3) アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、GTP、アルカリフォスファターゼ、総ビリルビン、アルブミン、コリンエステラーゼ、乳酸脱水素酵素、アルカリフォスファターゼ（ALP）、総コレステロール、中性脂肪、尿酸、C-反応性タンパク質、クレアチニンキナーゼ、CK-MB、直接ビリルビン（DBIL）、アルブミン：グロブリン比、梅毒定性、HBs抗原、HCV抗体、トロポニンT、Dダイマー定性、血液型、ヘモグロビン、フィラデルフィア染色体、ビタミンB12、ミオシン軽鎖、アルドステロン濃度、レニン活性及びHbA1cからなる検査項目の少なくとも2項目を測定し得る、該項目を免疫学的に測定するための抗体または抗原がスライドガラス基板上に固定化された病態解析チップ、

(4) アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、GTP、アルカリフォスファターゼ、総ビリルビン、アルブミン、コリンエステラーゼ、乳酸脱水素酵素、アルカリフォスファターゼ（ALP）、総コレステロール、中性脂肪、尿酸、C-反応性タンパク質、クレアチニンキナーゼ、CK-MB、直接ビリルビン（DBIL）、アルブミン：グロブリン比、梅毒定性、HBs抗原、HCV抗体、トロポニンT、Dダイマー定性、血液型、ヘモグロビン、フィラデルフィア染色体、ビタミンB12、ミオシン軽鎖、アルドステロン濃度、レニン活性及びHbA1cからなる30の検査項目のうち20以上を測定し得る、該項目を免疫学的に測定するための抗体または抗原がスライドガラス基板上に固定化された病態解析チップ、

(5) 抗体または抗原を固定化した側をさらに血液中不溶物除去フィルターで覆った、

(1)から(4)のいずれかに記載の病態解析チップ、

(6) 血液中不溶物除去フィルターが透析膜である(5)の病態解析チップ、(7)

(1)から(6)のいずれかの病態解析チップおよび蛍光色素で標識された検査項目を免疫学的に測定するための抗体または抗原を用いて病態を解析する方法、

10

20

30

40

50

(8) (1)から(6)のいずれかの病態解析チップおよび蛍光色素で標識された検査項目を免疫学的に測定するための抗体または抗原を含む病態解析用キット、

(9) (1)から(6)のいずれかの病態解析チップおよび簡易採血デバイスを含む病態解析キット、および

(10) (1)から(6)のいずれかの病態解析チップを血液検査を受けようとする被験者に渡し、被験者の血液を塗布した病態解析チップを回収し、該病態解析チップを用いて検査項目を測定することを含む病態解析チップを用いて病態を解析する方法。

【0010】

【発明の実施の形態】

1. 病態解析チップの作製

本発明の病態解析チップは、適当な基板上に特定の疾患に関連した抗原または抗体に結合し得る抗体または抗原タンパク質を固相化することにより作製し得る抗体チップまたはタンパク質チップである。ここで抗体またはタンパク質チップとは、基板上に抗体またはタンパク質を整列(アレイ)固定化させたデバイスを総称していう。基板の大きさおよび基板上に整列させる抗体またはタンパク質の数に限定はなく、基板上に2つ以上の抗体またはタンパク質が固定化されている限り抗体またはタンパク質チップに含まれる。また、本発明の抗体またはタンパク質チップを抗体またはタンパク質マイクロアレイともいう。

【0011】

抗体またはタンパク質を固定化する基板としては、DNAチップにおいてDNAを固定化する基板を用いることができ、例えば、抗体チップスライド(登録商標)(クロンテック社、米国)等の疎水表面加工を施したスライドガラス、ポリスチレン処理したスライドガラス等が上げられるがこれらには限定されない。

【0012】

抗体またはタンパク質を基板上に固定するには、DNAマイクロアレイ作製に用いられる市販のマイクロアレイ作製システムを用いることができる。市販のマイクロアレイ作製システムとして、例えば日立ソフトのSPBILが挙げられる。病態解析のための各検査項目に対応する血中抗原または抗体の濃度に合わせて、固定化しようとする抗体または抗原タンパク質を適切な濃度に調製し、固定化すればよい。この際、抗体またはタンパク質の濃度の調製には、生理食塩水、リン酸緩衝液、Tris緩衝液、クエン酸緩衝液、ホウ酸塩緩衝液、炭酸塩緩衝液、などを用いればよく、濃度は $0.01 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは $0.01 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。固定化する抗体はポリクローナル抗体でもよいし、ポリクローナル抗体が結合する抗原に結合し得るモノクローナル抗体又はその機能的断片でもよい。機能的断片としては、具体的には $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv 、ジスルフィド結合 Fv 、一本鎖 $Fv(scFv)$ 、及びこれらの重合体等が挙げられる。また、抗原タンパク質もそのタンパク質の全アミノ酸を有するものでもよいし、各抗原タンパク質を認識する抗体が結合するエピトープを含むタンパク質の断片でもよい。従って、本明細書において、抗体チップまたはタンパク質チップという場合、抗体の断片またはタンパク質の断片が固相化されたチップも含まれる。適切な濃度に調製した抗体またはタンパク質溶液を前記マイクロアレイ作製システムを用いて、スライドガラス上に直径 $100 \sim 400 \mu\text{m}$ で、好ましくは $100 \sim 200 \mu\text{m}$ 、さらに好ましくは $150 \mu\text{m}$ で固定化する。例えば 19cm^2 のスライドガラスならば、直径約 $100 \sim 400$ でスポットすることにより、1枚当たり最大で5000種類以上の抗体またはタンパク質を固定化することができる。図1にマイクロアレイ作製システム(日立SPBIL)を用いた本発明の病態解析チップの作製方法を示す。図1に示す方法は、一例であり本発明の病態解析チップの作製方法が図1に示す方法に限定されることはないが、準備したスライドガラス上にスポッターを用いて抗原または抗体をスポットすればよい。この際、スポットしようとする抗原または抗体は例えば96ウェルマイクロタイタープレートに分注しておき、スポッターが該プレートとスライドガラスの間を往復することにより次々とスポットすることができる。本作製システムは後述のように被検体である生体試料および蛍光色素で標識した第2抗体の添加にも用い得る。

10

20

30

40

50

【0013】

また、図2に抗体をスポットしたチップの図を示す。スライドガラスはクロンテック社のものを用いている。直径200 μm でピッチを400 μm でスポットした場合、約5000のスポットが可能である。

【0014】

固定化を行った後には、スライドガラスをブロックエース（カゼイン分解物、大日本製薬製）、BSA溶液等のブロッキング剤を用いてブロッキングを行い、その後適切な洗浄液を用いて洗浄する。

【0015】

ブロッキングを行ったスライドガラスを乾燥させることにより1～3年にわたって保存することができ、各スライドガラスを含む抗体またはタンパク質チップキットを作製することができる。

10

【0016】

生体試料として全血を用いる場合、全血をスライドガラスに滴下した後、そのまま放置しておくると赤血球、白血球等の血球やフィブリノーゲン等の不溶物が乾燥固着し、その後の蛍光標識2次抗体との結合反応および蛍光強度測定に影響してしまう。この影響を避けるため、スライドガラスに全血を滴下した後に精製水、生理食塩水、緩衝液等でスライドガラス表面を洗浄し、血球等の不溶物を洗い流す必要がある。また、スライドガラスに抗原または抗体を固定化させた後、スライドガラスの抗原または抗体を固定化した側を赤血球、白血球等の血球やフィブリノーゲン等の不溶物を透過させず、これらの不溶物をろ過・除去できるフィルターで覆ってもよい。用いるフィルターは、全血中の血球やフィブリノーゲンを透過させないものならば何でもよいが、セルロース膜、ガラス繊維濾紙、ニトロセルロース膜、布、ナイロン膜等を単独でまたは組合わせて使用することができる。例えば、ポアサイズ0.45 μm 以下のメンブランフィルター、好ましくは0.22 μm 以下のメンブランフィルター、透析用の膜が例示できる。透析用の膜としてポリスルホン酸膜、キュプロファン膜、エチレンビニルアルコール膜等を使用することができ、テルモ株式会社、川澄の市販品を用いることができる。これらの膜を1から5枚を重ねてスライドガラスを覆う。通常1枚でも全血中の血球の透過を阻止できるが、1枚だけではフィブリノーゲンが透過し得るので、2枚から5枚で覆うのが望ましい。さらに、膜の表面をさらに多孔性材料で覆ってもよく、多孔性の材料で覆うことにより、孔中に血球やフィブリノーゲンが捕捉されるので、血球およびフィブリノーゲンの透過をより効率的に阻止することができる。また、多孔性材料のみでスライドガラスを覆ってもよい。多孔性の材料は限定されず、濾紙、ガラス繊維濾紙、布、綿等を用いることができる。これらの多孔性材料には必要に応じて、緩衝液を染み込ませておいてもよく、また抗赤血球抗原抗体、抗体フィブリノーゲン抗体等の血液中不溶物を捕捉し得る物質を結合または染み込ませておいてもよい。

20

30

【0017】

スライドガラスをフィルターで覆う方法は限定されないが、スライドガラス上の抗体または抗原が固定化されていない部分で接着剤を介してフィルターとスライドガラスを結合させるか、または熱、超音波で溶着させてもよい。この場合、スライドガラス上の抗体または抗原が固定化されていない部分は、抗体または抗原が固定化されている側でもよいし固定化されていない側でもよい。例えば、フィルターをスライドガラスの表側面積より大きい面積を有するように成形しておいて、スライドガラスをフィルターで覆い、フィルターの余った部分をスライドガラスの反対側に折り返してスライドガラスの反対側に超音波で溶着すればよい。

40

【0018】

すなわち、本発明は、抗体または抗原を固定化した側を血液中不溶物除去フィルターで覆った病態解析チップをも包含する。この病態解析チップは、特に被験者が家庭で自ら採血し全血を病態解析チップに滴下する際に被験者が血球等の不溶物の除去操作をする必要がないので、好ましい。

50

【0019】

本発明の病態解析チップにおいて、基板上に固定化する抗体またはタンパク質の種類は限定されないが、CRP、ヘモグロビン等の健康診断における基本検査のための抗体または抗原タンパク質、トロポニン、ローダイマー等の緊急検査のための抗体または抗原タンパク質、胃潰瘍および十二指腸潰瘍検査のための抗体または抗原タンパク質、心筋梗塞検査のための抗体または抗原タンパク質、本態製高血圧症検査のための抗体または抗原タンパク質、糖尿病検査のための抗体または抗原タンパク質、肝炎検査のための抗体または抗原タンパク質、腫瘍マーカー検査のための抗体または抗原タンパク質、感染症における検査のための抗原もしくは抗体、またはアレルギー検査のための抗原等が挙げられ、これらの抗体のうちの複数種の抗体またはタンパク質が用いられる。

10

本発明の病態解析チップを用いて測定する病態解析のための検査項目としては、限定するものではないが以下のものが挙げられる。

【0020】

例えば、一般的な健康診断で測定される検査項目で本発明の病態解析チップで測定しうる項目として以下の項目がある。肝機能検査項目として、総タンパク、アルブミン、アルブミン/グロブリン比、総ビリルビン量、直接ビリルビン量、GOT、GPT、 γ -GTP、アルカリフォスファターゼ(ALP)、LDH、コリンエステラーゼ(CE)、ロイシンアミノペプチダーゼ(LAP)、クレアチンキナーゼ(CPK)が挙げられ、B型肝炎ウイルス検査項目としてHBs抗原、HBs抗体、HBe抗原、HBe抗体が挙げられ、C型肝炎ウイルス検査項目としてHCV抗体が挙げられ、脂質系検査項目として総コレステロール、中性脂肪、HDL-コレステロール、 β -リポ蛋白、LDLが挙げられ、尿酸検査項目として尿酸が挙げられ、腎機能検査項目としてクレアチニンが挙げられ、膵機能検査項目として血清アミラーゼ、Pアミラーゼが挙げられ、血清学検査としてリウマトイド因子(RA)、C反応性タンパク質(CRP)、抗ストレプトリジンO価(ASLO)が挙げられ腫瘍マーカー検査項目としてAFP、CEA、CA19-9、前立腺特異抗原(PSA)が挙げられ、甲状腺検査項目として甲状腺刺激ホルモン(TSH)が挙げられ、血清蛋白分画検査項目としてアルブミン、 α 1-グロブリン、 α 2-グロブリン、 β -グロブリン、 γ -グロブリンが挙げられ、出血凝固検査項目としてヘパプラスチンが挙げられる。これらの総ての項目を測定できるように、対応する抗原または抗体を本発明の病態解析チップ上にスポットしてもよいし、これらの項目の中から検査の必要性が高いものを適宜選択してスポットしてもよい。

20

30

【0021】

さらに、生化学検査、内分泌学的検査、免疫学的検査、腫瘍マーカー検査等の一般的に臨床検査で測定される項目も選択できる。どのような検査項目を選択するかは、例えば、可合忠および橋本信也編、日本医師会障害教育シリーズ 臨床検査のABC、医学書院、1997年9月15日発行を参考にすれば決定できる。

【0022】

チップにスポットする抗体、抗原は市販のものを用いることができるし、また抗原が入手できれば、公知の方法で容易にモノクローナル抗体を得ることが可能である。例えば、本発明の病態解析チップで測定する項目として、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、 γ -GTP、アルカリフォスファターゼ、総ビリルビン、アルブミン、コリンエステラーゼ、乳酸脱水素酵素、アルカリフォスファターゼ(ALP)、総コレステロール、中性脂肪、尿酸、C-反応性タンパク質、クレアチンキナーゼ、CK-MB、直接ビリルビン(DBIL)、グロブリン(アルブミンとグロブリンを測定することによりアルブミン:グロブリン比がわかる)、梅毒定性、HBs抗原、HCV抗体、トロポニンT、Dダイマー定性、血液型、ヘモグロビン、フィラデルフィア染色体、ビタミンB12、ミオシン軽鎖、アルドステロン濃度、レニン活性、HbA1cが挙げられる。血液中の抗原を測定する場合は、該抗原に結合する抗体をチップ上にスポットすればよく、また血液中の抗体を測定する場合は、該抗体に結合する抗原をチップ上にスポットすればよい。上記検査項目の場合、アラニンアミノト

40

50

ランスフェラーゼ (ALT) に対しては抗アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 抗体、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) に対しては抗アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 抗体、GTP に対しては抗 GTP 抗体、アルカリフォスファターゼに対しては抗アルカリフォスファターゼ抗体、総ビリルビンに対しては抗ビリルビン抗体、アルブミンに対しては抗アルブミン抗体、コリンエステラーゼに対しては抗コリンエステラーゼ抗体、乳酸脱水素酵素に対しては抗乳酸脱水素酵素抗体、アルカリフォスファターゼ (ALP) に対しては抗アルカリフォスファターゼ (ALP) 抗体、総コレステロールに対しては抗コレステロール抗体、中性脂肪に対しては抗中性脂肪抗体、尿酸に対しては抗尿酸抗体、C - 反応性タンパク質に対しては C - 反応性タンパク質抗体、クレアチンキナーゼに対しては抗クレアチンキナーゼ抗体、CK - MB に対しては抗 CK - MB 抗体、直接ビリルビン (D. BIL) に対しては抗ビリルビン抗体、グロブリンに対しては抗グロブリン抗体、梅毒定性に対しては抗梅毒菌抗体、HBs 抗原に対しては抗 HBs 抗体、HCV 抗体に対しては HCV 抗原、トロポニン T に対しては抗トロポニン T 抗体、Dダイマー定性に対しては抗 Dダイマー抗体、血液型に対しては抗血液型抗原抗体、ヘモグロビンに対しては抗ヘモグロビン抗体、フィラデルフィア染色体に対しては抗フィラデルフィア染色体抗体、ビタミン B 1 2 に対しては抗ビタミン B 1 2 抗体、ミオシン軽鎖に対しては抗ミオシン軽鎖抗体、アルドステロン濃度に対しては抗アルドステロン抗体、レニン活性に対しては抗レニン抗体、Hb A 1 c に対しては抗 Hb A 1 c 抗体をそれぞれ病態解析チップにスポットすればよい。

10

【0023】

20

この他、HIV 感染症、HCV 感染症等も測定項目として挙げられる。さらに、腫瘍マーカーも本発明の病態解析チップで測定可能な項目として挙げられる。例えば、腫瘍マーカー抗原としては、フェトプロテイン、フェリチン、CEA、TPA、CA 19 - 9、SCC、PSA、NSE、CA 72 - 4、SLX、BCA 225 等が挙げられ、これらのマーカー抗原に結合する抗体を病態解析チップ上にスポットすればよい。

【0024】

これらの検査項目の多くは、一般的な健康診断の際に測定される項目であり、これらを測定することができる病態解析チップにより、極めて短時間で効率的にすべての項目を検査することができる。

【0025】

30

本発明は、本発明の病態解析チップを含む病態解析を行うためのキットも包含される。このキットは、病態解析チップに加えて蛍光色素で標識された測定項目を免疫学的に測定するための抗体または抗原を含み得る。さらに、このキットは、病態解析チップに加えて家庭で簡単に少量の全血を採血するための採血デバイスを含み得る。この場合、検査を行う検査主体が、血液検査を受けようとする被験体にキットを渡し、家庭で採血し採血液を病態解析チップに滴下し乾燥させ、検査主体に戻してもらうことにより、血液検査を実施することができる。採血用デバイスとしては公知のものを使用することができるが、例えば、皮膚を傷つけ出血させるための針または小刃と血液を採取するためのキャピラリーのセット等がある。

【0026】

40

2. 病態解析チップを用いての病態解析

上記のようにして作製した病態解析チップを作製後直ぐに、または保存後に用いて病態解析を行うことができる。病態解析チップに生体試料を滴下するか、あるいは前記マイクロアレイ作製システムを用いて塗布することにより病態解析チップ上の抗体またはタンパク質と生体試料を反応させる。病態解析チップに生体試料を滴下する方法は、一個体の被験体からの生体試料を用いるが、前記マイクロアレイ作製システムを用いて塗布する場合は、あらかじめ 1 枚の病態解析チップ上に同じ検査項目に対応する抗原または抗体を固定化しておく。こうすることにより、1 枚のスライドガラスで一度の多数の被験体からの生体試料を測定することができる。例えば、図 2 に示すチップにおいて 1 2 のブロックの抗体または抗原の固定化パターンを同一にしておけば、そのチップは 1 2 の被験体からの生体

50

試料について一度に多項目を検査することが可能である。ブロック数はスポットのパターンで任意に増減できるので、例えば5000のスポットが可能であるならば、1被験体につき50項目測定するとして、1枚の病態解析チップを100のブロックに分け、一度に100の被験体からの生体試料を用いて50検査項目について測定できる。生体試料は、ヒトから採取された試料であり、具体的な例としては、全血、間質液、血漿、血管外液、脳脊髄液、滑液、胸膜液、血清、リンパ液、唾液、尿などを挙げるができるが、好ましいのは全血、血清、血漿であり、特に好ましいのは全血である。本発明の病態解析チップを用いる解析において、生体試料は病態解析チップ1枚当たり5 μ L~100 μ Lで足りる。採血行為は有資格者しか行えず、従来の比較的大量の試料を必要とする検査を受けるには、有資格者のいる病院等に出向いて血液を採取しなければならず、検査を受けようとする被験者の負担も大きかった。本発明の病態解析チップにおいては、極微量の試料で多数項目の検査が可能であり、しかも血球等を除去しない全血が使用できるため、極めて少量の採血で検査が可能であり、被験者の負担も大きく減じられる。さらに、例えば被験者が自ら針、簡易採血デバイス等を用いて全血を数 μ L採取し、採取した全血を病態解析チップに塗布し、検査機関に送付することにより検査機関で検査を行い、後で結果を知ることにも可能である。通常は、採取した全血を検査項目の血中濃度に応じて生理食塩水等を用いて適当に希釈して用いる。

10

【0027】

血液を塗布した後に一定時間反応させる。反応時間は、数分でよい。反応後、結合に関与しない抗原または抗体を除去するためにチップを洗浄する。その後、蛍光色素で標識した2次抗体を滴下するか、あるいは前記マイクロアレイ作製システムを用いて塗布し、一定時間反応させる。該反応の反応時間も数分でよい。なお、2次抗体は病態解析チップに抗体を固定化する場合は、それぞれに特異的に結合する抗原タンパク質またはその断片に結合し得る抗体を蛍光色素で結合したものが用いられる。また、病態解析チップに抗原を固定化する場合は、試料中に含まれる抗体に結合する抗体、すなわち抗ヒトイムノグロブリン抗体またはその機能的断片を蛍光色素で標識したものが用いられ得るし、あるいは2次抗体の代わりに抗原を標識したものをを用いてもよい。チップ上に固定化した抗体または抗原と標識抗体または抗原との結合態様は種々のものが考えられ、例えばビオチン・アビジンの結合を介した様式も考えられる。要は、チップ上に固定化した抗体または抗原に結合した試料中の抗原または抗体の量が蛍光強度を指標に測定できればよく、どのような様式にするかは当業者ならば適宜決定できる。蛍光色素としては、フルオレセイン、ローダミン等の公知の蛍光色素を用いればよく、標識も公知の方法で行えばよい。

20

30

【0028】

病態解析チップ上の蛍光標識抗体または抗原の発する蛍光強度は、CRBIO（日立ソフト）等のマイクロアレイスキャナーで読み取り、抗体チップ上の各抗体または抗原を固定化した部分の蛍光強度をCHIP Space（日立ソフト）等のチップ情報処理ソフトで解析することにより、試料中の抗体または抗原を定量することが可能になる。

【0029】

さらに、本発明は病態解析チップを血液検査を受けようとする被験者に渡し、被験者の血液を塗布し乾燥させた病態解析チップを回収し、検査項目を測定することを含む病態解析チップを用いて病態を解析する方法をも包含する。この場合の病態を解析する主体は、病院、検査センター等であり、血液検査を受ける被験者へ病態解析チップを渡す方法は、郵送、手渡し、業者による宅配等によればよい。被験者による全血の塗布は上記方法で行うことができる。全血を塗布した病態解析チップの回収は郵送、手渡し、業者による宅配等によればよい。検査結果は、被験者に郵送、手渡し、業者による宅配等により渡せばよい。

40

【0030】

【実施例】

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されない。ヒトPSA（前立腺特異抗原の測定）

50

抗ヒトPSA（前立腺特異抗原）ウサギポリクローナル抗体（サンタクルーズ社）をPBS、0.05% Tween 20で希釈し、市販の96ウェルマイクロタイタープレートに25μLずつ分注し、4℃で一晩静置してプレートのウェル内に吸着結合させた。プレートをPBS、0.05% Tween 20を用いて3回洗浄した後、ブロックエース（大日本製薬）を用いてブロッキングした。次いで、PSA標準品（サンタクルーズ社）を上述のブロックエースで10μg/mL～1000μg/mLに希釈して、25μLずつウェルに分注し、室温で2時間反応させた。反応後ウェルをPBS、0.05% Tween 20を用いて3回洗浄した。次いで、PBS、0.05% Tween 20を用いて希釈したフルオレセイン標識抗ヒトマウスモノクローナル抗体をウェルに25μLずつ分注し、10分間反応させ、蛍光分光光度計で各ウェルの蛍光強度を測定した。

10

【0031】

図1に測定結果を示す。図に示すようにPSA標準品の濃度が数十ng/mLでも検出できた。この結果は酵素標識抗体を用いたMatsumoto K.ら、Clinica Chimica Acta 281, 57-69 (1999)に記載のELISA法による測定感度より5倍以上良好であった。このことより、蛍光標識抗体を用いて測定する本発明の病態解析チップを用いた場合に、良好な感度が予測される。

【0032】

【発明の効果】

本発明の病態解析チップを用いることにより、簡便かつ迅速に多項目の検査を効率的に行うことができ、被検体の病態を容易に解析できる。

20

【図面の簡単な説明】

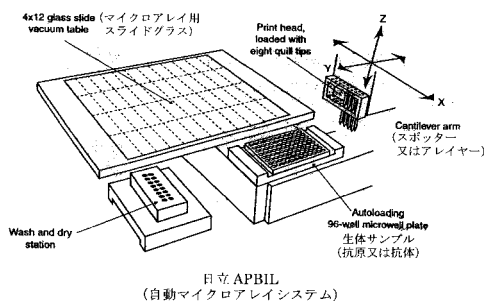
【図1】スライドガラスに抗原または抗体をスポットして病態解析チップを作製する方法を示す図である。

【図2】抗体をスポットしたスライドガラスを示す図である。

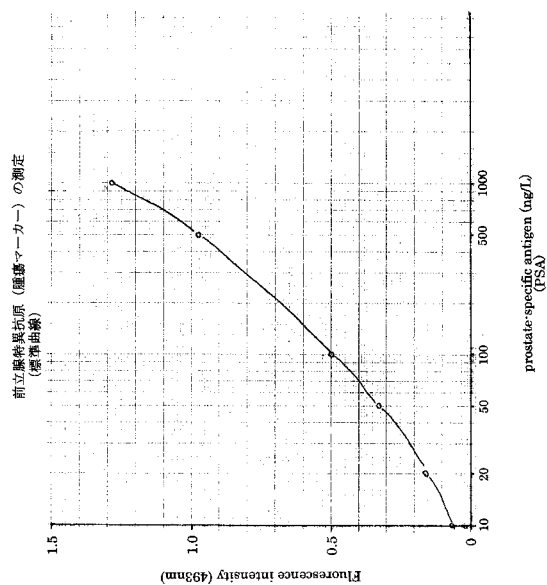
【図3】蛍光標識抗体を用いてヒトPSAを測定したグラフである。

【図1】

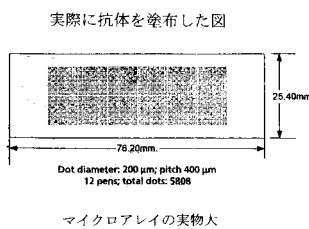
クロンテック社（抗体チップ用スライド）に抗原または抗体タンパクを塗布する装置（日立SPBIL）



【図3】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 服部 直彦

静岡県小笠郡菊川町西方154 株式会社 バイオサイバー内

(72)発明者 川口 健

東京都品川区上大崎3-14-37 バルチックストーンビル 有限会社 生理科学研究所内

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特開2002-250725(JP,A)

特開2001-258868(JP,A)

特開2001-235468(JP,A)

特開2003-021639(JP,A)

国際公開第01/092870(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

G01N 33/53-579

G01N 37/00 102

专利名称(译)	使用抗体或抗原的疾病分析芯片及其使用方法		
公开(公告)号	JP3581360B2	公开(公告)日	2004-10-27
申请号	JP2002358188	申请日	2002-12-10
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社生理科学研究所		
申请(专利权)人(译)	有限会社生理科学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社生理科学研究所		
[标]发明人	菰田二一 服部直彦 川口健		
发明人	菰田 二一 服部 直彦 川口 健		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/576 G01N37/00		
FI分类号	G01N33/53.D G01N37/00.102 G01N33/543.521 G01N33/566 G01N33/576.B		
其他公开文献	JP2004191129A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供通过将多种抗体和/或蛋白质固定在基质上而形成的病理分析芯片。ZSOLUTION：该病理分析芯片是通过将两种或多种抗原或抗体固定在载玻片基板上而形成的。通过使用病理分析芯片，可以简单，快速和有效地执行具有许多项目的检查，并且可以容易地分析对象的病理。Z

