

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-349690
(P2006-349690A)

(43) 公開日 平成18年12月28日(2006.12.28)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
GO1N 37/00 (2006.01)	GO1N 37/00	102 4B029
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	D
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/53	M
GO1N 33/547 (2006.01)	GO1N 33/53	U
GO1N 33/545 (2006.01)	GO1N 33/53	V

審査請求 有 請求項の数 29 O L (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-200601 (P2006-200601)	(71) 出願人	506252956 メクレンブルグ ミカエル スウェーデン国 ルンド ラヴェンデルヴ アーゲン 3
(22) 出願日	平成18年7月24日 (2006.7.24)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(62) 分割の表示	特願平9-543108の分割	(72) 発明者	メクレンブルグ ミカエル スウェーデン国 エス-227 38 ル ンド ラヴェンデルヴァーゲン 3
原出願日	平成9年6月24日 (1997.6.24)	(72) 発明者	ダニエルソン ベン スウェーデン国 エス-245 62 ハ イアラップ プロムステルガルド 33
(31) 優先権主張番号	9602545-7	(72) 発明者	ウインケスト フレデリック スウェーデン国 エス-584 37 リ ンチエピング ハイデンスタムズ 34
(32) 優先日	平成8年6月25日 (1996.6.25)		
(33) 優先権主張国	スウェーデン(SE)		F ターム (参考) 4B029 AA07 FA12

(54) 【発明の名称】広範な特異性を有する親和性アレイ：複合試料の識別のための定量的手法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 固体支持体上に固定された離散的な生物的検出素子のアレイを用いて複合の生物試料を識別するための方法を提供する。

【解決手段】 センサーハイブリッドアレイに結合した成分をその表面上の質量の増加を測定することによって直接決定し、データ解析を神経回路網または統計学に基づいたパターン認識法を用いて行う。好ましい態様において、特殊な条件下で試料とセンサーハイブリッドアレイとを接触し、非結合性の試料成分を除去し、表面上の質量増加を決定し、パターン認識ソフトウェアを用いて前記質量増加データと参照用基準とを比較し、可溶性成分の存在に関して液体試料を測定する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

- (a) 表面を含む固体支持体；
- (b) 該表面の全部または一部の上に固定された自己集合性分子の少なくとも 1 つの層；及び
- (c) 該固体支持体上に均一な生物的層を形成する生物的界面を介して該自己集合性分子上に固定された複数の生物的検出素子；を含む離散的な生物的検出素子のアレイ。

【請求項 2】

- 生物的検出素子が、
- (a) 表面を含む固体支持体を提供する工程；
 - (b) 該表面の全部または一部を自己集合性分子で処理する工程；
 - (c) 該自己集合性分子に生物的界面を固定して均一な生物的層を形成する工程；及び
 - (d) 該生物的界面に生物的検出素子を固定化する工程；を含む方法によって固定化される請求項 1 記載のアレイ。

【請求項 3】

離散的な生物的検出素子が、金表面、末端に活性化可能な基を有する長鎖チオールアルカン類、疎水性 / 親水性パターン成形、EDC / NHSカップリングアミノ-ビオチン、およびストレプトアビシンの使用を含む方法によって固定されている、請求項 1 または 2 記載のアレイ。

【請求項 4】

固体支持体が、シリコン、ガラス、雲母、合成樹脂、白金、銀、銅、金およびそれらの混合物からなる群より選択される、請求項 1 または 2 記載のアレイ。

【請求項 5】

ストレプトアビシン (SA) がほぼ 100% の表面カバレッジを形成しており、それにより試料が SA 層の下の表面と直接的に相互作用するのを防ぐものである、請求項 3 または 4 記載のアレイ。

【請求項 6】

SA が、密度 $60,000 \pm 5\% \text{ SA/mm}^2$ の均質な単層を形成する、請求項 3 ~ 5 のいずれか一項に記載のアレイ。

【請求項 7】

検出素子が、抗体、レクチン、核酸、糖質、脂質、改変された生体分子、ならびにそれらの混合物および勾配物からなる群より選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のアレイ。

【請求項 8】

検出素子が、非生物的由来であるが、シクロデキストランおよびその誘導体、ロキサンおよびその誘導体、テンプレート重合体またはインプリント重合体、ならびにそれらの混合物からなる群より選択される生物様認識性を有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のアレイ。

【請求項 9】

検出素子が、タチナタマメ、バンディラエア・シンプリシフォリア (*Bandeiraea simplifolia*) BS-1、ラッカセイ、アメリカヤマゴボウ、インゲンマメpha-e、コパラミツ (*artocarpus integrifolia*)、トリティカム・ブルガリス (*Triticum vulgaris*)、エンドウからなる群より選択されるレクチンである、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のアレイ。

【請求項 10】

レクチン要素が、さらなるレクチンもしくはレクチン様検出素子を含むよう拡張されている、および / または他の生物的検出素子と組み合わせて用いられる、請求項 7 または 9 記載のアレイ。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

- (a)表面を含む固体支持体の提供；
- (b)疎水性厚膜パターン成形；
- (c)該表面の全部または一部の自己集合性分子での処理；
- (d)ビオチンまたはビオチン誘導体のカップリング；
- (e)ビオチン結合分子の結合；及び
- (f)該ビオチン結合分子を介するビオチン化生物的検出素子の固定；

を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のアレイの製造方法。

【請求項 1 2】

試料を識別するための方法であって、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の離散的な生物的検出素子のアレイを用い、該アレイに結合した成分により生ずる該アレイ表面の質量または厚さの増加を測定することによって決定されるシグナルパターンにより識別する方法。 10

【請求項 1 3】

質量または厚さの増加の決定が、非標識検出システムを用いて行われる、請求項 12 記載の方法。

【請求項 1 4】

方法のデータ解析が、神経回路網または統計学に基づいたパターン認識技術を用いて行われる、請求項 12 または 13 記載の方法。

【請求項 1 5】

試料を識別するための方法であって、

(a)請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の離散的な生物的検出素子のアレイを用い、何らかの成分が存在する場合に該検出素子が該試料中の成分と結合できるような条件下で該試料と該アレイとを接触させる工程；

(b)実質的にすべての非結合性の試料成分を除去する工程；

(c)表面上の該成分の質量または厚さの増加を決定することによる該結合成分の直接的な検出をする工程；及び

(d)それにより生成された該試料のパターンと参照用基準とのパターン認識ソフトウェアを用いた比較をする工程；

を含む方法。 30

【請求項 1 6】

表面の質量増加の検出技術が、水晶発振子天秤、光音響法、反射率測定法、円二色法、SAW、および表面プラスモン共鳴法からなる群より選択される、請求項 12 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

表面質量の検出が、CCD カメラを用いた画像化様式にて行われる、請求項 12 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

試料が、疾患に罹患している患者から採取した試料であり、基準が該疾患を持たない個体に存在するパターンである、請求項 15 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 1 9】

試料が、ヒトまたは動物の、血液、血清、尿、乳、汗、呼気、皮膚、骨髄、脳脊髄液、関節液、羊水、およびリンパ液からなる群より選択される組織または体液である、請求項 18 記載の方法。

【請求項 2 0】

疾患が、遺伝性疾患、自己免疫疾患、関節炎、感染症、癌、心疾患、薬物乱用、HIV、B SE、および肺疾患からなる群より選択される、請求項 18 または 19 記載の方法。

【請求項 2 1】

試料が、患者から採取した試料であり、基準が該患者の集団の典型的な部分に存在するパターンである、請求項 15 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。 50

【請求項 2 2】

試料が、高血圧、妊娠、感冒、外傷、炎症反応、軽度の免疫抑制、ドーピング、高山病、宇宙病、慢性疲労症候群、ならびに低濃度の毒性化学物質若しくは放射線曝露、月経周期若しくは無症状性感染の影響からなる、頻度の高い軽度の病気および／または広汎性の症状を伴う健康状態から選択される病気または症状を有する患者から採取されたものである、請求項21記載の方法。

【請求項 2 3】

試料が、動物、微生物、真菌、ウイルス、細菌、植物、および原生動物からなる群より選択される生物または植物から採取された組織または抽出物である、請求項12～17のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 2 4】

試料が、環境試料であり、基準が混入のない試料に存在するパターンである、請求項15～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

環境試料が、空気、土壤、水、岩、氷、植物、地衣類、動物および食品材料からなる群より選択される未処理のまたは抽出された試料である、請求項24記載の方法。

【請求項 2 6】

検出素子が、純粹な形、混合の形、およびそれらの混合物における勾配において用いられる、請求項12～25のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 2 7】

請求項1～10のいずれか一項に記載のアレイまたは請求項11記載の方法により製造されるアレイ、および表面結合検出のための適当な手段を選択的に含む、診断用ツール。

【請求項 2 8】

請求項12～26のいずれか一項に記載の方法のための生物的検出素子の使用。

【請求項 2 9】

請求項1～10のいずれか一項に記載のアレイ、または請求項11記載の方法により製造されたアレイの、請求項12～26のいずれか一項に記載の方法のための使用。

30

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本発明は、広範な特異性を有する親和性アレイ及びそれを用いた複合試料の識別のための定量的手法に関する。

発明の概要

本発明は、複合試料の識別のための方法として、中間的な親和性および特異性（広範な特異性）を備えた離散的な検出素子（sensing element）のアレイを用いて生成された複雑なパターンを解析するために、神経回路網および統計ソフトウェアの能力を利用する。アレイ中の各素子が許容しうる信号対雑音比を有するように、適切な親和性および特異性を備えた離散的な検出素子が選択される。このアッセイの方法によって得られる情報内容は、従来の方法、すなわち陽性-陰性型解析（positive vs negative analysis）を用いて解析した場合には無意味になると考えられる。したがって、神経回路網および統計ソフトウェアを非制限的に用いて行われるパターン認識に基づくデータ解析手順は、複合試料の識別を可能とするために、開発および／または適合化する必要がある。パターン認識により、この診断方法の増大した情報内容を完全に利用する識別過程の基礎が形成される。

40

【0 0 0 2】

このため、特定の検出素子に結合した既知の化合物の正確な量を定量化する（従来の診断法がそうであったように）代わりに、結合した材料は、センサー表面上の厚みまたは質量の増加を測定することによって定量される。これは、水晶発振子天秤、光音響法、反射率測定法、円二色法および表面プラスモン共鳴法（SPR）などの光学的技法を非制限的に含む多数の非標識検出原理を用いて達成しうる。本方法の本質的な局面は、このアッセイを行うためには、検出素子に結合した成分を同定する必要はないという事実である。これ

50

は、自然界に見いだされるような複雑な相互作用を有する認識素子の使用を可能とする。試料は、パターン認識を用いてアレイ全体から得られる値の関連づけ、および参照用試料との比較によって識別される。これは速度を高め、アッセイを行うために必要な時間を短縮し、それによってコストを削減させるが、これらはすべて本発明の目的である。

【0003】

本発明の1つの態様において、血清試料などの複合試料を識別するための診断用ツールとして、レクチンのアレイが神経回路網解析とともに用いられる。レクチンは、経験的に開発された高密度固定化手順を用いて、金でコーティングされた平面上にあるアレイ中の離散的な領域上に固定される。本発明のこの態様は、遊離した、または蛋白質（糖蛋白）、脂質（糖脂質）および他の生体分子と結合した、レクチンに対する親和性を有する天然および合成の糖類、オリゴ糖類およびその他の未知のリガンドをレクチンが認識する能力を利用する。すべての生きた生物体に糖質（carbohydrate）が遍在的に存在することから、複合の生物試料を同定するためのほぼ普遍的な手段が提供される。これらの糖質を合成するために用いられる複雑な生合成経路は、それらの環境におけるわずかな変化により影響を受ける。これらの変化は、その組成およびそれ故に糖質の構造に一連の複雑かつ全体的な改変をもたらす。

【0004】

本発明は、従来の診断法においてルーチン的に行われているように特異的なレクチンに結合した特定の化合物の正確な量を定量化する代わりに、得られる情報の量を増やすためにこの多様性を用いる。レクチンのアレイを用いることにより、複合試料における全体的な変化の同定が可能となり、このために識別が可能となる。本発明者らは、特定の検出素子に対する広範な親和性を有する多くの異なる物質が、レクチン上の認識部位と競合すると想定している。本発明のさらなる目的は、生体分子上に存在するまだ同定されていない認識能を利用するアッセイ方法の能力である。これらの同定されていない認識素子により、前例のない精度を有し、他のどの診断用アッセイ方法によっても現時点では不可能な、試料の識別を可能とする情報が提供されると思われる。この複雑な相互作用により、コンピューター技術および信号処理技術における急速な発展のために迅速に解析できるようになつた、大量のデータが提供される。さらに、検出素子アレイの能力は、このアッセイにおいてより多くの生体分子が検討され、それらの未知の認識機能が明らかになるにつれて、劇的に高まると考えられる。

【0005】

本発明の用途には、さまざまな動物種に由来する血清を識別するためのレクチニアレイの使用が含まれる。これらの試験では、アレイ中の各レクチンに結合した成分が、固定角円二色計によって定量化される。これらの実験から得られた反応は、人工的神経回路網の訓練に用いられた。適切な正規化法（normalization method）を用いることにより、その結果得られた回路網は、すべての血清試料を識別することができた。このアッセイでは、複合の生物材料の一般的な同定に関する本発明の有用性が示されている。レクチン親和性アレイのもう1つの用途は、「健康な」個体（ヒト）と「罹患した」個体を識別することであった。これらの実験では、軽症の細菌感染症に伴つてみられるような血清組成のわずかな変化であつても（適切な正規化法を用いた人工的神経回路網を用いて）同定できることが示されている。これらの実験では、SPR検出原理を用いて、レクチンに結合した物質を定量化した。この結果、試料の識別は、特定の非標識法に依存しておらず、非標識様式において検出要素に結合した物質を解放させうる任意の検出器に対して普遍的に適用可能であることが示されている。

【背景技術】

【0006】

化学センサーのアレイは、複合の気体混合物または匂いを同定および分類するために用いることができる（非特許文献1、2）。化学センサーは一般に非特異的であるが、匂いの中の分子種に対しては異なる選択性パターンを有する。より具体的には、視覚的に同定しうる嗅覚の像を得るために、金属酸化物半導体の電解効果構造物におけるさまざまな触

10

20

30

40

50

媒性金属からなる大型の検出表面 (sensing surface) を、光学的評価技法とともにいかに用いるかが示されている（非特許文献3）。この増加した情報内容が、センサーレイに関する、検出表面に沿って（連続的に）変化する選択性プロフィールに由来することを特記しておくことは重要である。離散的な認識素子の存在は知られていない。これらのセンサーから信号パターンを評価するために、統計的手法または人工的神経回路網に基づくさまざまなパターン認識法を用いることができる。こうした装置は、種々の食品材料を分析するために用いられている（非特許文献4、5）。

【0007】

【非特許文献1】Shurmer, H.V., 電子的な鼻：哺乳動物嗅覚系に関する高感度かつ識別性の代替物 (An electronic nose: A sensitive and discriminating substitute for a mammalian olfactory system)、IEEE proc. G 137, 197~204, 199; Gardner 10

【非特許文献2】J.W.およびBartlett, P.N. (編)、電子的な鼻のためのセンサーおよび知覚系 (Sensors and Sensory Systems for an Electronic Nose)、Proc NATO Advances Research Workshop, Reykjavik, 1992

【非特許文献3】I. Lundstrom, R. Erlandsson, U. Frykman, E. Hedborg, A. Spetz, H. Sundgren, S. WelinおよびF. Winquist、光パルス法を用いた化学センサーからの人工的「嗅覚」画像 (Artificial 'olfactory' images from a chemical sensor using a light-pulse technique)、Nature, 352, 47~50, 1991

【非特許文献4】Winquist, F., Hornsten, E.G., Sundgren, H.およびLundstrom, I.、挽き肉の品質評価のための電子的な鼻の性能 (Performance of an electronic nose for quality estimation of ground meat)、Meas. Sci. Technol. 4, 1493~1500, 1993 20

【非特許文献5】Winquist, F., Hornsten, G., Holmberg, M., Nilsson, LおよびLundstrom, I.、単純化したセンサーレイおよび神経回路網を用いた細菌の分類 (Classification of bacteria using a simplified sensor array and neural net)、投稿中

【発明の開示】

【0008】

新たなセンサーの概念 これらのセンサーと、嗅覚系などの生物的感覚系のセンサーとの類似点は、この技術の開発を進める上で概念的に重要であった。ヒトの嗅覚に関する基盤は、嗅球の受容細胞から信号パターンが生成されることである。受容細胞は特定の分子に特異的ではなく、異なる選択性のクラスに属する。嗅覚（匂いをかぐこと）に関する基盤は、低い特異性の受容体クラスのそれから得られる信号を組み合わせることであると思われる。この結果として生じる組み合わせ効果は、（受容体のクラスが比較的少数であるにもかかわらず）システムの識別能を高めることにつながる。化学的検出素子は、匂いを認識しうるが、生体分子および合成生体模倣分子が有する離散的な認識能を欠いている。上記の通り、化学センサーは認識素子として連続的勾配および他の手法を用いており、離散的ではない。自然界は、生物的文脈における認識能を進化させた、離散的に同定可能な検出素子を用いている。本発明の1つの目的は、診断用アッセイにおける情報内容を増加させる様式で、離散的なバイオセンサー素子を適用することである。これには、従来の診断法では非常に不明確であるために有用でないと通常は考えられている広範な認識特性を備えた生体分子の使用が必要であると思われる。この特異性は、十分に広範な結合性は得られるが（高い情報内容）特異的および非特異的な結合の間の区別は不可能であるようす、すなわち適切な信号対雑音比であるように選択される必要がある。同時に、生物的検出素子は、このアッセイ方法に適した明確な結合特性を有する必要がある。 30 40

【0009】

本明細書に記載される発明には、従来のアッセイよりもはるかに情報的に豊かな生体認識素子のアレイを用いて複合試料を識別するための新たなアッセイ方法の開発が含まれる。本発明のもう1つの目的は、診断がなされる前に行う必要のある検査の数を減らし、それによって治療開始に必要な時間ならびにコストを少なくすることである。既知の化合物を高度に特異的に検出する標準的な診断用検査とは異なり、本発明者らは、未知の化合物のレクチンに対する結合を検出する。このため、この新たなアッセイ方法は、水晶発振子 50

天秤や、光音響法、反射率測定法、円二色法および表面プラスモン共鳴法 (SPR) などの光学的技法を非制限的に含む、特殊化された非標識に基づく検出法を必要とする。固体表面から反射した偏光に基づくすべての方法は、固体表面上の蛋白質の厚みの決定のために有意義であることがすでに実証されている。この方法の感度はほぼ同じであり、数オングストロームのオーダーである。

【0010】

即ち、本発明は、下記発明に関する。

(1) 固体支持体上に固定された、広範な認識特性を有する離散的な生物的検出素子のアレイであって、該検出素子に結合されている成分に、該アレイの表面の厚さまたは質量の増加によるシグナルパターンを生成させることができるアレイ。 10

(2) 異散的な生物検出素子が、金表面、末端に活性化可能な基を有する長鎖チオールアルカン類、疎水性 / 親水性パターン成形、EDC / NHSカップリングアミノ-ビオチン、およびストレプトアビジンの使用を含む方法によって固定されている、上記(1)記載のアレイ。

(3) 固体支持体が、シリコン、ガラス、雲母、合成樹脂、白金、銀、銅、金およびそれらの混合物からなる群より選択される、上記(1)または(2)記載のアレイ。

(4) ストレプトアビジン (SA) がほぼ100%の表面カバレッジを形成しており、それにより試料がSA層の下の表面と直接的に相互作用するのを防ぐものである、上記(1)~(3)のいずれか一つに記載のアレイ。 20

(5) SAが、密度 $60,000 \pm 5\% \text{ SA/mm}^2$ の均質な単層を形成する、上記(1)~(3)のいずれか一つに記載のアレイ。

(6) 検出素子が、抗体、レクチン、核酸、糖質、脂質、改変された生体分子、ならびにそれらの混合物および勾配物からなる群より選択される、上記(1)~(5)のいずれか一つに記載のアレイ。

(7) 検出素子が、非生物的由来であるが、シクロデキストランおよびその誘導体、ロキサンおよびその誘導体、テンプレート重合体またはインプリント重合体、ならびにそれらの混合物からなる群より選択される生物様認識性を有する、上記(1)~(5)のいずれか一つに記載のアレイ。

(8) 検出素子が、タチナタマメ、バンデイラエア・シンプリシフォリア (*Bandeiraea simplicifolia*) BS-1、ラッカセイ、アメリカヤマゴボウ、インゲンマメpha-e、コパラミツ (*artocarpus integrifolia*)、トリティカム・ブルガリス (*Triticum vulgaris*)、エンドウからなる群より選択されるレクチンである、上記(1)~(7)のいずれか一つに記載のアレイ。 30

(9) レクチン要素が、さらなるレクチンもしくはレクチン様検出素子を含むよう拡張されている、および / または他の生物的検出素子と組み合わせて用いられる、上記(6)~(8)のいずれか一つに記載のアレイ。

(10) (a) 金表面の提供；
 (b) 疎水性厚膜パターン成形；
 (c) 末端に活性化可能な基を有する長鎖チオールアルカン類での処理；
 (d) EDC / NHSによる該表面の活性化；
 (e) 過剰のアミノ-ビオチンによる活性化表面のカップリング；
 (f) ビオチンまたはビオチン誘導体によるストレプトアビジンの固定

を含む、上記(1)~(9)のいずれか一つに記載のアレイの製造方法。

(11) 固体支持体上に固定された離散的な生物的検出素子のアレイを用いて複合の生物試料を識別するための方法であって、センサーレイに結合した成分が、該アレイ表面の質量または厚さの増加を測定することによって決定されるシグナルパターンを生成する方法。

(12) 質量または厚さの増加の決定が、非標識検出システムを用いて行われる、上記(1)記載の方法。

(13) 方法のデータ解析が、神経回路網または統計学に基づいたパターン認識技術を用

いて行われる、上記(11)または(12)記載の方法。

(14) 固体支持体上に固定された離散的な生物的検出素子のアレイを用いて複合の生物試料を識別し、可溶性成分の有無に関して液体試料を検討するための方法であって、何らかの成分が存在する場合に該検出素子が該試料中の成分と結合できるような条件下での該試料と該センサーアレイとの接触、実質的にすべての非結合性の試料成分の除去、表面上の該成分の質量または厚さの増加を決定することによる該結合成分の直接的な検出、それにより生成された該試料のパターンと参照用基準とのパターン認識ソフトウェアを用いた比較を含む方法。

(15) アレイが、上記(1)~(9)のいずれか一つに記載のアレイである、上記(11)~(14)のいずれか一つに記載の方法。

(16) 表面の質量増加の検出技術が、水晶発振子天秤、光音響法、反射率測定法、円二色法、SAW、および表面プラスモン共鳴法からなる群より選択される、上記(11)~(15)のいずれか一つに記載の方法。

(17) 表面質量の検出がCCDカメラを用いた画像化様式にて行われる、上記(11)~(16)のいずれか一つに記載の方法。

(18) 疾患を診断する方法であって、シグナルパターンにより疾患が診断され、試料が患者試料であり、基準が該疾患を持たない個体に存在するパターンである、上記(11)~(17)のいずれか一つに記載の方法を含む診断法。

(19) 患者試料が、ヒトまたは動物の、血液、血清、尿、乳、汗、呼気、皮膚、骨髄、脳脊髄液、関節液、羊水、およびリンパ液からなる群より選択される組織または体液である、上記(18)記載の方法。

(20) 疾患が、遺伝性疾患、自己免疫疾患、関節炎、感染症、癌、心疾患、薬物乱用、HIV、BSE、および肺疾患からなる群より選択される、上記(18)または(19)記載の方法。

(21) 全般的健康状態を診断する方法であって、シグナルパターンにより特定の健康状態であることが診断され、試料が患者試料であり、基準がその集団の典型的な部分に存在するパターンである、上記(11)~(20)のいずれか一つに記載の方法を含む診断法。

(22) 全般的健康状態が、高血圧、妊娠、感冒、外傷、炎症反応、軽度の免疫抑制、ドーピング、高山病、宇宙病、慢性疲労症候群、ならびに低濃度の毒性化学物質または放射線曝露、月経周期および無症状性感染の影響からなる、頻度の高い軽度の病気および/または広汎性の症状を伴う健康状態から選択されるものである、上記(21)記載の方法。

(23) 生物体を同定する方法であって、シグナルパターンが特定の生物体に特有であり、試料が特定の生物体由来の生物試料であり、基準が該生物体において通常認められるパターンである、上記(11)~(17)のいずれか一つに記載の方法を含む同定法。

(24) 生物試料が、動物、微生物、真菌、ウイルス、細菌、植物、および原生動物からなる群より選択される組織または抽出物である、上記(23)記載の方法。

(25) 毒性化合物が混入した試料を同定するための方法であって、シグナルパターンにより混入材料が診断され、試料が環境試料であり、基準が混入のない試料に存在するパターンである、上記(11)~(17)のいずれか一つに記載の方法を含む同定法。

(26) 環境試料が、空気、土壤、水、岩、氷、植物、地衣類、動物および食品材料からなる群より選択される未処理のまたは抽出された試料である、上記(25)記載の方法。

(27) 検出素子が、純粋な形、混合の形、およびそれらの混合物における勾配において用いられる、上記(11)~(26)のいずれか一つに記載の方法。

(28) 上記(1)~(9)のいずれか一つに記載のアレイまたは上記(10)記載の方法により製造されるアレイ、および表面結合検出のための適当な手段を選択的に含む、診断用ツール。

(29) 上記(11)~(27)のいずれか一つに記載の方法のための検出素子の使用。

(30) 上記(1)~(9)のいずれか一つに記載のアレイ、または上記(10)記載の方法により製造されたアレイの、診断解析を目的とする使用。

【0011】

生物的検出素子 蛋白質は、種々のリガンドと特異的および可逆的に結合する能力を有

10

20

30

40

50

する。例えば酵素は基質および阻害剤と結合し、糖質、蛋白質および低分子などの種々の抗原と結合する抗体が産生されうる。もう1つのクラスの蛋白質であるレクチンは、糖類との結合能を有し、酵素活性は持たない。受容体は、広範囲のリガンドと、高度の親和性および特異性をもって結合する。自然界は、特定の目的のために適切な親和性および特異性を備えた、特殊な目的のための蛋白質を進化させて維持している。したがって、生物的または合成的な生体模倣検出素子を使用することは、生物的意義を持つ変化を同定するための最も適切な手法である。本発明者らは、本明細書に記載された本発明のバイオセンサー親和性アレイを、レクチンを用いて検討することを選択した。本発明者らはレクチンに関する説明し、本発明の用途において、このクラスの蛋白質が、一般的に用いられている免疫に基づく診断法よりもはるかに優れているいくつかの利点を挙げる。

10

【0012】

生物的認識素子としてのレクチン 以前に記述されている通り、レクチンは糖質および類似した構造を有する化合物と結合する（分子およびツールとしてのレクチン（Lectins as molecules and tools）、Lis, H. および Sharon, N. Ann. Rev. Biochem., 55, 35~67, 1986; Advances in Lectin Research Vo. 1, Franz, H. 編、Springer-Verlag, Berlin, 187pp., 1987）。また、レクチンは、細胞を凝集させる能力を有し、多糖類および糖蛋白を沈降させ、非免疫由来である。これは、それらの構造がオリゴマーであり、通常はサブユニット1つ当たり1つの糖結合部位を含むという事実のためである。この点で、レクチンは抗体と同様の凝集能を有する。また、それらは低分子量化合物による阻害が可能であり、レクチンの場合には、それらは单糖類、オリゴ糖類などの低分子の糖質またはそれらを含む巨大分子である。

20

【0013】

第1に、レクチンは、例えば抗体および酵素と比べて、高度の交差反応性を備え、広範なスペクトルにわたり明確な結合特異性を提供する。さらに、それらは安定であり、広範な親和性および特異性を有する。これに加えて、100種を超えるレクチンの特徴が明らかにされている。今日では、レクチンが発生過程および動物成体において種々の細胞間相互作用を媒介することが判明している（Drickamer, K. および Taylor, M.E.、動物レクチンの生物学（Biology of Animal Lectins）、Annu. Rev. Cell Biol., 9: 237~64, 1993）。これは、レクチンの発現パターンが、発生過程の全体を通じて、広範な環境変化に応じて変化することを示すデータによって裏づけられる [Varki, A.、オリゴ多糖の生物的役割：理論はすべて正しい（Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct）、Glycobiology, 3: 97~130, 1993]。炎症に反応して起こる免疫系によるセレクチンを介した細胞-細胞間認識 [Lasky, L.A.、セレクチン：炎症時の細胞特異的糖質情報の通訳者（Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation）、Science 258: 964~969, 1992]、および受精時の精子-細胞間認識 [Miller, D.J., Macek, M.B., Shur, B.D.、精子表面b1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼと卵コートZP3との間の相補性が精子-卵結合を媒介する（Complementarity between sperm surface b1,4-galactosyltransferase and egg coat ZP3 mediates sperm-egg binding）、Nature 357: 589~593, 1992] におけるオリゴ糖の関与はそのいくつかの例である。グリコシドおよびグリコシルトランスフェラーゼの発現の変化が正常発生を妨げることも知られている。しかし、ステージ特異的および組織特異的な発生過程に対する個々の单糖類残基およびオリゴ多糖鎖の個々の寄与を規定することはこれまで不可能であった。

30

【0014】

本発明の1つの目的は、複雑で基礎的な発達過程を詳細に記述するために用いられる複合試料を識別しうるという本アッセイ方法の能力である。

40

【0015】

第2に、レクチンの研究は糖質のそれと密接に関連しており、糖鎖生物学と呼ばれている（糖蛋白（Glycoproteins）、Hughes, R.C., outline Studies in Biology, Chapman and Hall, London and New York, 95pp., 1983）。グリコシル化は、自然界ではプロテア-

50

ゼ防御などのある程度一般的なものの、血清からの蛋白質の除去などのシグナル伝達機構などの特定のクラスの蛋白質を指向するもの、および細胞接着などのある程度高度に特異的なものなど、広範な目的で広く用いられている。また糖質は、制御機構として、細胞の局在化のため、別の細胞種による1つの細胞種の特異的細胞表面認識のため、血清からの特定の糖形態の除去のためのシグナルとして働き、おそらくは蛋白分解に対する防御を提供することによって蛋白質フォールディングを補助する (Parekh, R.B.、蛋白質の機能に対するグリコシル化の影響 (Effects of glycosylation on protein function)、*Curr. Opin. Struct. Biol.* 1: 750~54, 1991)。

【0016】

糖質は、他のいかなる生体オリゴマーよりも数桁多い潜在的な情報内容を含んでいる。例えれば、糖の六量体およびアミノ酸の六量体に関して可能な構造の数を算出してみると、その数値は $>1.05 \times 10^{12}$ および 4.6×10^4 である。この差は7桁を上回る。したがって、糖類は明らかに、生物界において単一の源による多様性を最も多く提供する (Laine, R.A.、Invited Commentary in Glyco-Forum section Glycobiology 1994 8, 759~767)。

【0017】

レクチンは、種々の病原体に対する防御にも重要であることが示されている。動物におけるマンノース結合性レクチンは、それらの表面に高濃度のマンノースを含む病原体との抗体非依存的な結合を媒介する。これらの単糖類は、一般に、哺乳動物系における血清または細胞表面糖蛋白の末端部位には認められない。この認識事象は、補体力スケードを惹起しうる [Ikeda, K., Sanno, T., Kawasaki, T. および Yamashima, I. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 7451~7454]。植物レクチンも、共生性窒素固定菌のマメ科植物の根への付着、および真菌性病原体に対する植物のイントエー (int eh) 防御に関与することが示されている (Bohlool, B.B. および Schmidt, E.L. (1974) *Science* 185: 269~71)。

【0018】

第3に、多くの病原体は、それらの宿主に侵入するために糖質-レクチン相互作用を用いている。例えれば、細菌およびアメーバなどの腸内寄生虫は、上皮細胞に対する生物体の糖特異的付着を媒介し、それによって感染を促進する (Liener, I.E., Sharon, N., Goldstein, I.J. 編 (1986)、レクチン: 特性、機能ならびに生物学および医学における応用 (The Lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine)、New York: Academic.)。インフルエンザウイルス (ミクソウイルス) およびセンダイウイルス (パラミクソウイルス) などのウイルスは、シアル酸を含む受容体を標的細胞の表面に結合させてウイルス-細胞相互作用を惹起するために、赤血球凝集蛋白質を用いている (Paulsson, J.C.、動物ウイルスと細胞表面受容体との相互作用 (Interaction of animal viruses with cell surface receptors)、受容体 (The Receptor) (第2巻) (P.M. Conn編) 中、Academic Press, New York, pp131~219, 1985)。

【0019】

本発明のもう1つの目的は、細胞内に侵入するために糖質またはレクチンを用いる疾患の病因を検討することである。

【0020】

セレクチンなどの糖質結合蛋白質は、炎症を含む免疫応答において極めて重要な役割を果たすと考えられている (Springerら、1991 *Nature* 349: 196~197; Philips.ら、1990 *Science* 250: 1130~32)。特異的な糖質リガンドが同定されており、それらのセレクチン蛋白質および / または他のレクチンとの相互作用を介して、炎症抑制、免疫抑制のために用いられている (Gaetaら、1990年6月15日に提出された米国特許出願第07/538,853号に相当するUS-A-5,576,305; Ippolitoら、1992年5月26日に提出された米国特許出願第07/889,017号に相当するUS-A-5,374,655)。その他の糖蛋白も、哺乳動物の免疫応答の抑制に有用であることが示されている (Smithら、1992年10月2日に提出された米国特許出願第07/956,043号に相当するUS-A-5,453,272)。

【0021】

本発明のもう1つの目的は、免疫および炎症反応におけるセレクチンおよび他のレクチ

10

20

30

40

50

ンを非制限的に含むレクチンのより巧妙な認識機能を詳細に描写するために、本アッセイ方法を用いることである。

【0022】

第4に、多数の糖類および糖結合蛋白質の広い分布および即時的な利用可能性を、それらの自然界の全体にわたる偏在性と組み合わせることは、溶液中および細胞表面上の糖質を検討するための試薬としてのそれらの広範な使用につながる。それらは最初、血液型の分類のため (LisおよびSharon)、細胞の同定および分離のため (Sharon, N. 1983, *Adv. Immunol.* 34: 213~98) に用いられた。標識されたレクチンは、ゲル上にて分離された糖蛋白を直接的またはプロッティング後に検出するための試薬として役に立つ (Rohringer, R., Holden, D.W. 1985 *Anal. Biochem.* 144: 118~27)。固定されたレクチンは、インスリン受容体 (Hedo, J.A., Harrison, L.C., Roth, J. 1981 *Biochemistry* 20: 3385~93) および他の多くの蛋白質などの糖蛋白の分離のために日常的に用いられている。レクチンは胸腺細胞および脾細胞などの細胞を分離するために広く用いられている (Reisner, Y., Sharon, N. 1984 *Methods Enzymol.* 108: 168~79; Maekawa, M., Nishimune, Y. 1985 *Biol. Reprod.* 32: 419~25)。レクチンを用いて多数の細菌が分類されている (Doyle, R.J., Keller, K.F. 1984 *Can. J. Microbiol.* 3: 4~9; DeLucca, A.J. II 1984 *Can. J. Microbiol.* 3: 1100~4)。特異的な糖残基の存在によって靈長類を非靈長類から区別することができる [Spiro, R.G. および Bhoyroo, V.D. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 9858~9866; Galili, U., Shohet, S.B., Kobrin, E. Kobrin, E., Stuls, C.L.M. および Macher, B.A. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 17755~17762]。これらの用途は、可溶性生体分子または細胞もしくは細胞小器官のいずれかに付着した糖質を特異的に同定しうる特定のレクチンの能力に堅固に依存している。

【0023】

第5に、ほとんどの細胞は、膜糖蛋白および糖脂質 (真核生物において) または多糖類 (原核生物において) の形態で糖鎖コーティングを有する。真核生物では、細胞種およびグルコース濃度などの環境因子が、種および組織の両方に関して特異的な、グリコシル化の程度および種類の決定に主要な役割を果たしている (Parekh, R.B., Dwek, R.A., Thomas, J.R., Opdennakker, G., Rademacher, T.W. (1989) *Biochemistry* 28: 7644~7662; Goochee, C.F. および Monica, T. (1990) *Bio/Technology* 8: 421~427)。さらに、それぞれの個々の酵素反応は完了することも、完了せずに糖形態またはグリコシル化された変種の蛋白質を生じることもある (Rademacherら、*Ann. Rev. Biochem.*, 1988 57: 789~838)。これらの因子は、糖質構造に、インピボで認められ、それらの分析を困難にしている莫大な不均質性を生じさせる。しかし、場合によっては、異なる形態の相対的な濃度が、特定の健康および疾患状態において特殊な様式で異なることが示されている。例えば、このことは、天然の糖蛋白のグリコシル化パターンが妊娠などの生理的変化および慢性関節リウマチなどの疾患によっても影響される理由の説明にもなる。

【0024】

これに加えて、個々の单糖類とCRDとの間の相互作用は、レクチンの糖蛋白に対する親和性が生じる原因としてはあまりに弱いことが知られている。オリゴマー性レクチン (多価) には、多分枝型オリゴ糖類に関する特異性および親和性をいずれも高める糖質認識部位 (CRD) が集中している。これらの効果は十分には解明されていないが、CRDの密度に生物的意義があることは明らかである。このため、本明細書で用いられる付加的なパラメーターにより、本アッセイの情報内容をさらに増加させることができる。これは、複合の生物試料の全体的な状態における変化の後にレクチンが有用なことを示すと考えられる。この豊富な多様性により、それから選択されるセンサー素子にほとんど無限の範囲が提供される。

【0025】

糖質に対するレクチンの多価性は、それらの生物活性に重要であると考えられる。したがって、本発明の1つの目的は、試料の識別のための、連続的および非連続的ならびに均質および不均質な形式における、表面上のレクチンの濃度勾配の適用にあると考えられる

10

20

30

40

50

。これにより、認識過程に対する結合部位の密度の影響に関する基礎的な理解を得るために、独自なツールが提供される。当業者は、走査および画像化様式のために反射率測定法、円二色法およびSPRを適合させるための方法を利用できる。これにより付加的なアッセイ用パラメーターも提供され、このためレクチン親和性アレイの情報内容は増加し、それによってそれらが複合試料を識別する能力も改善される。

【0026】

診断用アッセイ方法 現在、イムノアッセイに基づく診断法は市場において主流であるが、にもかかわらず、レクチンには従来のイムノアッセイを上回るいくつかの利点がある。レクチンは大部分の生物形態に存在しており、より重要なことに、それらは免疫グロブリンを合成しない植物、微生物およびウイルスなどの生物形態において認められる。明らかに、レクチンの生物的機能は免疫系のそれに先行しており、その多くは現時点では不明である。したがって、これらの検出素子は、同定および分類のために、より有用であると考えられる。異なるクラスのレクチン同士に認められる高度の相同性は、これらの蛋白質が進化を通じて保存されてきたことを示しており、それらが生物体における重要な機能を持つことを強く示す所見でもある。もう1つの違いは、レクチンは構造的に多様であるが、一方、抗体は構造的に類似していることである。この構造的な多様性は、アッセイ形式の柔軟性を高めると思われる、それに対応する安定性の多様性をもたらす（抗体はそれらの構造的類似性のために同様の条件下では変性する傾向がある）。したがって、レクチンは抗体の多価性と酵素の構造的多様性を兼ね備えている。糖質の代謝および糖の輸送に関与するものなどのように、糖質と結合する他の蛋白質も存在する。一般に、これらの蛋白質は1つの糖質のみと結合し、レクチンとは極めて異なる目的に有用である。

【0027】

血液、血清、痰、尿などの体液における特定の抗原、ハプテンおよび同様の物質の検出は、研究的および臨床的な環境のいずれにおいても非常に重要である。このようなリガンドの検出はしばしば種々の罹患状態との関連づけが可能であり、その結果として、診断において、疾患の発生に関する基礎的な理解を得るために、ならびに治療的処置の有効性をモニターするために、非常に重要である。疾患を診断および治療する能力が高く、現在も常に高まっていることは、診断用検査に対する需要の爆発的な増加をもたらした。1回のアッセイ当たりのコストは低下しているが、一方、実施される検査の件数は劇的に増加している。これは一部には利用可能な検査の数が増えていることに起因し、一部には医療従事者が、彼らに対して訴訟（医療過誤訴訟）が行われる際に自らの行為を正当化しうる必要性があることに起因する。

【0028】

したがって、水性試料中のリガンドを検出するための改良された方法が常に求められている。特に好ましい方法またはアッセイは、より迅速で、より柔軟で、実施および製造がより容易であることに加えて、製造コストが低いものである。さらに、HIVおよびウシ海綿状脳症（BSE）などの病原体に関する診断用アッセイを開発するために必要な時間を短縮すると思われる方法に対する需要も高まっている。医療費の増加のために、新しい、迅速で、より有効な診断方法の開発が求められている。

【0029】

一般に、イムノアッセイは、抗体、抗体断片またはさらにはペプチド、テンプレート重合体などの抗体結合部位を模した人工的に作製された素子などの蛋白質と、それらにとつて特異的な物質であるリガンドとの間の免疫的反応（以下では抗体認識と呼ぶ）に基づく。免疫反応は、それらの高い特異性、およびそれ故にこの特徴を利用するためにはじた多数の機構を特徴とする。目標は、できるだけ少ない数のアッセイを用いて絶対的な特異性で特定の状態を同定することである。

【0030】

伝統的な不均質前方アッセイ（heterogenous forward assay）では、抗体は、微粒子、マイクロタイター用ウェル、パドル（paddle）などの固相上に固定される。続いて試料を固定された抗体と接触させ、試料中に存在していればリガンドが結合する。結合した物質

10

20

30

40

50

は検出され、直接的または間接的にそれと関連した実体として定量化される。このような検出可能な実体には、蛍光分子、化学発光分子、酵素、同位体、微粒子などが含まれる。競合、間接的競合などの多くの変種が開発されている。当業者には、これらのアッセイを用いて結合した物質の量を定量化するための種々の方法が利用可能である。

【0031】

イムノアッセイのほかに、蛋白質（レクチン、受容体など）、核酸、糖類、脂質および／または合成／組換え生体模倣化合物などの広範囲にわたる認識素子を用いて絶対的な特異性に対する同じ需要に基づいて、その他の診断用アッセイも利用しうる。疾患を特異的に同定するために、顕微鏡、クロマトグラフィーおよび電気泳動を非制限的に含む広範囲にわたる基礎的技法も開発されている。

10

【0032】

本発明の1つの目的は、診断用アッセイの情報内容を増加させるために、低い親和性を有する検出素子のアレイに依拠した試料識別のためのアッセイ方法を提供することである。本アッセイ方法は、微妙な変化を識別することができ、このため極めて重要な可能性のある健康状態の変化を早期に同定することを可能とする。場合によっては、従来のアッセイに用いられる検出素子も適用可能であると思われる。しかし、ほとんどの場合には、これらの試薬の特異性は使用するには高すぎると思われる。したがって、親和性および特異性の適切な組み合わせを有する試薬を単離するために新たなスクリーニング手順が開発されると考えられ、それは本発明の目的である。

20

【0033】

本アッセイ方法は、疾患の同定、宿主（ヒト、動物、植物および微生物を非制限的に含む）内における疾患自体によって引き起こされる変化の同定を非制限的に含む、複合試料の識別を要する広範囲の用途に拡張することができる。複合試料には、生物材料および／または飲料、乾物などのような食品材料（望ましくない微生物の増殖、鮮度、物理的障害に関する品質管理を非制限的に含む）などを非制限的に含む分解産物、ならびに空気、土壤および水の試料における菌叢（微生物の含有量および組成を無限定的に含む）、汚染物質およびそれらの分解産物に関する環境試料の制御が含まれる。この方法およびそれに基づくアッセイは、ヨーグルト、ビール、ワインなど、肉汁を無限定的に含む発酵工程、遺伝子組換え細菌などから得られるインスリンなどの微生物過程によって生産される生物的化合物などの産物が生産される発酵工程、ならびに調味料などのために製造される香辛料および動物用食品材料の製造に用いられる発酵工程を観測するためにも用いうると思われる。

30

【0034】

ヘモグロビン、血圧などの全般的健康状態を調べるために用いられる現在の診断用検査の手法では、限定的な情報しか得られない。また、これらの検査は全般的健康状態に関する有用な情報を提供するものの、疾患を同定するための十分な情報は提供せず、疾患を早期に検出するために必要な、微妙な変化を十分に検出しうるほどには鋭敏ではない。したがって、実施する必要のある特異的な検査の数を減らすために、罹患している患者の病気の種類に関する情報を提供する、罹患状態の同定のための新たな方法を開発することには需要がある。

40

【0035】

本発明のもう1つの目的は、病気を早期に同定し、それによってこれまで可能であったと思われるよりも早期に治療を開始できるようにする努力を補助するために全般的健康状態を観測するための改良された技法に関する方法およびアッセイを提供することである。疾患の早期治療により、医療費が減らせることが示されている。この方法は、予防的医療の図式においても有用であると考えられる。同様の状況は、食品材料および環境試験にも存在する。

【0036】

広範な認識特異性を有する離散的認識素子と、コンピューターを用いた人工的神経回路網データ分析との併用に基づくこの診断方法は、適切な特異性（信号対雑音比）を備えた

50

離散的な合成生体模倣認識素子とともに用いることもできる。これらは改変された生物材料から作られたものでも、従来のテンプレート技法などによって重合性材料から作られたものでもよい。本発明のこの態様は、有機溶媒、高温または低温、酸性または塩基性の溶液および塩類を非制限的に含む従来の生物的検出素子の結合親和性および／または特異性を破壊または劇的に抑制すると思われるアッセイ条件を必要とする用途において特に有用であると考えられる。

【0037】

これらの検出技法は、シリコンウェーハまたは平面ガラスなどの平坦表面に対する再現性が高い高密度固定化法を必要とする。これらの検出技法と適合しうるその他の表面には、合成樹脂、シリコン、雲母およびガラス表面であって金属コーティングがなされたものまたはなされていないものの両方が非制限的に含まれる。標準的な固定手順では、信号対雑音比が不適切であるために全体的な再現性は乏しい。生物活性の高い保持性を有して生体分子を高密度に固定し、同時に非特異的結合アッセイを最小限に抑えることを可能とする方法が開発された。増加した感度および低下した非特異的結合により、このアッセイ方法に不可欠である高い信号対雑音比が達成される。本発明者らは現在、ほぼ100%の表面カバー率であると考えている。これは、金属表面との直接的な相互作用を予防し、本質的に均質な相互作用基質を提供し、表面密度を最大にする。

【0038】

本方法は、血液、血清、唾液、痰、尿などの体液を非制限的に含む、複合試料を他の由来物から識別し、それによって既知の参照用基準との複雑な相関づけ（パターン認識プログラムを用いての）を可能とするために用いられると考えられる。空気、土壤、水など、食品材料などのほか、それに関する適切な検出素子を見いだしうる人工物質などの環境試料を、この方法を用いて分析しうる、すなわち、問題の試料に関して適切な信号対雑音比を得ることができる、と考えられる。同程度に迅速に、または同程度に高い費用対効果で、試料を識別しうる分析手法は、現在は存在しない。本発明の1つの重要な目的は、認識素子に存在する未知の認識機能を利用しうる本方法の能力である。

【0039】

本発明者らは、本レクチンアレイに結合した物質を同定するための試みをまだ何ら行っていないが、生体分子の同定に関する当業者には、この種の分析を行うための種々の方法が利用可能である。これは本発明の主たる目的ではないが、治療法の開発および／または治療薬の開発において補助となる可能性のある、生じた変化の性質を理解するために有用であることが判明する可能性もある。さらに、蛋白質、脂質、糖質および核酸や、遺伝子操作を加えられた、化学的に修飾されたものなどの改変された生体分子、ならびにシクロデキストラン、テンプレート重合体およびインプリント重合体などの分子認識に用いられる合成分子を非制限的に含む、このアッセイ方法に必要とされる特性を示す任意の認識素子も、この方式（regimen）において用いられると考えられる。

【0040】

本発明のもう1つの目的は、生体分子を固定するために用いられる複合型の手法であり、これには特殊な表面（金）、疎水性厚膜パターン成形、末端にカルボン酸基を有する自己集合性長鎖チオール、および経験的に決定されたEDC／NHS固定手順が含まれる。これらはすべて個々に用いられてきたが、これらの種々の技法を単一の統一的な手順にまとめた固定手順は存在していない。

【0041】

国際公開公報第95/29692号、国際公開公報第95/15175号、国際公開公報第95/28962号、国際公開公報第95/07462号、カナダ特許第2,133,772号、米国特許第4,289,747号、米国特許第4,389,392号、米国特許第4,298,689号および国際公開公報第95/26634号など、診断的および治療的目的のために広範囲にわたる生物検出素子を用いる多数の特許が開示されている。これらの発明はすべて、単一の疾患（または密接に関連した疾患群）を同定するために、それが抗体であるにせよレクチンであるにせよ、何らかの検出素子の特有の特異性を用いている。特異的反応を増強し、非特異的反応を抑制するために多大な試み

10

20

30

40

50

がなされているが、これは本明細書に記載された本発明とは極めて対照的である。

【0042】

国際公開公報第92/19975号は、糖類特異的な標識用試薬を用いて、複合の混合物において、蛍光分子による糖蛋白を標識するための方法を記載している。標識された蛋白質のこの混合物は分離され、パターン認識技法によってバンド形成パターンが分析される。

【0043】

本発明者らの発明は、この発明に比べていくつかの利点がある。第1に、アッセイの時間、労力、コストおよび複雑さを少なくする分離段階が含まれていない。第2に、認識素子が使われていないため、アッセイの柔軟性が制限される。第3に、認識素子が使われていないため、既知または未知である結合機能の分析は不可能である。最後に、アッセイを拡張することができず、パターン認識プログラムを十分に利用するというアッセイの能力が制限される。

【0044】

発明の詳細な説明

実施例1

これらの生物的検出素子を、表面質量に基づく光学画像化技術と整合させることは非常に難しい。標準的な固定化手順で得られる全体的な再現性は乏しいため、本発明者らは、表面パターン成形および固定化技術を組み合わせる高度に特殊化された手順を開発した(図1)。集積化されたアッセイ形式は厚膜表面パターン成形、自己集合性単層、効率的カップリング化学およびビオチン-ストレプトアビジンを組み合わせている。本手順では、金コートされたシリコンウェーハまたはガラスを、露出された金表面上にカルボキシ末端を有する自己集合性の長鎖チオールアルカンと組み合わせて成形するため、テフロン(登録商標)に基づく独自の厚膜印刷用インク(Cel-line、USA)を用いている。記載された通り(Martensson, J., Arwin, H.、基質層相互作用を含む金上の蛋白質層に関する立体的円二色法データの解釈(Interpretation of spectroscopic ellipsometric data on protein layers on gold including substrate-layer interaction)(1995)、Langmuir 11: 963~968)の蒸着により、研磨されたシリコンウェーハ(Wacker Chemie、Germany)またはガラスに金コートを施した。続いて、これらの表面に、厚膜技術(Cel-line、USA)を用いて独自の疎水性コーティングによるパターン成形を施した。この疎水性厚膜パターン成形は種々の試薬の位置を非常に単純化させ、それはアッセイ手順の全体的再現性を劇的に改良することにつながった。ウェーハは、EtOH中にて超音波処理を行った後に、HS-(CH₂)₁₆-COOH(エタノール中にて1mM)によって処理した。表面をEtOHによってすすぎ洗いし、続いてEtOH中にて超音波処理を行い、最後に再びEtOH中にてすすぎ洗いを行った。続いて、NHS(0.2mM)およびEDC(0.8mM)を用いて蒸留水中にて室温で60分間、表面を活性化させた。表面を蒸留水で簡単にすすぎ洗いし、窒素ガスを吹きつけて乾燥させた。アミノ-ビオチン(Molecular Probes、USA)を添加し(100mM重炭酸緩衝液、pH 8.5中にて1mM)、室温で60分間インキュベートした。表面を蒸留水で簡単にすすぎ洗いした後、50μg/mlのストレプトアビジン(Molecular Probes、USA)を含むHBST(150mM NaCl、0.1% tween 20および20mM Hepes、pH7.4)にて室温で30分間インキュベートした。表面を洗浄し、ビオチン化された選択対象の生体分子50μg/ml(HBST中に希釈)を適切なものに適用し、室温で60分間インキュベートした。概略を図1に示す。

【0045】

本発明のもう1つの目的は、生体分子を固定するために用いる複合型の手法であり、これには特殊な表面(金)、疎水性厚膜パターン成形、末端にカルボン酸基を有する自己集合性長鎖チオール、および経験的に決定されたEDC/NHS固定化手順が含まれる。これらはすべて個々に用いられてきたが、これらの種々の技法を单一の統一的な手順にまとめた固定手順は存在していない。

【0046】

固定化手順は、放射性標識がなされたストレプトアビジンまたはヒト血清アルブミンの量を定量化することによって経験的に最適化された。SAおよびHSAには、S³⁵蛋白質標識

10

20

30

40

50

試薬 (SLR) を用い、製造者 (Amersham, UK) の推奨に従って放射性標識を施した。二重標識のためには、HSAにまずビオチンによる光学標識、透析した後でSLRにより標識した。標識蛋白質 (通常 10^7 cpm / 蛋白質 μg) を、非標識蛋白質で希釈してウェルに添加した。固定された材料の量をフジホスホイメ・ジャー (Fuji Phosphorimager) を用いて定量化した。この手順の再現性は高かった ($n = 10$ 、標準偏差 = 5%)。表面密度の算出および他の所見から、SAが表面上に密着した単層として存在することが示されている。AFMならびに円二色法実験から、表面が極めて均一であることが示されている。さらに本発明者らは、放射性標識データを用いて、SAの充填密度が $60,000 \text{ SA/mm}^2$ であると算出している。これは理論的な充填値である $50,000 \text{ SA/mm}^2$ よりも 20% 高く、これらの実験に用いられた金表面の粗さによるものと考えられる。金の粒子サイズが 20nm (表面の原子間力顕微鏡像から決定) であることは、到達可能な面積にして $70,000 \text{ SA/mm}^2$ に相当する。十分なアッセイ再現性を達成するため、およびCRD密度勾配の効果を検討するためには、再現性の高い固定が絶対的に必要である。

【0047】

この手順を用いて、8つのビオチン化レクチン：タチナタマメ、バンデイラエア・シンプリシフォリア (Bandeiraea simplicifolia) BS-1、ラッカセイ、アメリカヤマゴボウ、インゲンマメpha-e、コパラミツ (artocarpus integrifolia)、トリティカム・ブルガリス (Triticum vulgaris)、エンドウのアレイのパターン成形を行った。ヒツジ、ヤギ、ブタおよびヒト (DAKO、Denmark) のプール血清をHBSTにて1:4に希釈し、各ウェルに $5\mu\text{l}$ を加えた。4で一晩インキュベートした後、試料を緩衝液で洗い、続いて蒸留水で簡単に洗った (円二色測定を妨害する過剰な塩類を除去するため)。続いて試料を、アプライドフィジクス (Applied Physics) 社の研究所で製造された走査型固定角円二色計のXYステージ上に配置した (Arwin, H., Lundstrom, I.、生物医学的分析のための表面配向光学法 (Surface orienited optical methods for biomedical analysis) (1988) Methods in Enzymology 137: 366~381; Jin, G., Tengvall, P., Lundstrom, I., Arwin, H. 生体分子相互作用の可視化のための画像偏光解析法に基づくバイオセンサー概念 (A biosensor concept based on imaging ellipsometry for visualization of biomolecular interactions) (1995)、Analytical Biochemistry, 232:69~72)。本装置は、平面偏光が適切な角度で試料表面に当たるような様式で配置された絞り、偏光子および多次4分の1減速プレート (multi-order quarter-retardation plate) 板を備えた 670nm ダイオードレーザー (Melles Griot、Sweden) からなる。反射光は光ダイオードを用いて測定した。試料の位置を調節するため、および光ダイオードから得られたデータを蓄積するためにコンピューターを用いた。レーザーからの光点のサイズは 1mm^2 のオーダーであり、これによって最大解像度が規定される。続いて、試料を走査することにより、表面に吸着された蛋白質の分布および量を評価または可視化できると思われる。本装置は最大 $20 \times 20\text{mm}$ の領域を最大解像度 200×200 ピクセルで走査することが可能であった。実験的な配列を図2に模式的に示した。データを定量化するために、実験で得られた生の数値を、画像解析プログラム Transform (Spyglass、U.S.A.) または NIH Image で処理した。

【0048】

このような1つの実験で得られたデータを図3に示す。このデータを、8種のレクチンに対応する8つのノードからなる3層人工的神経回路網に入力した。1回目の実行では、未処理の生データが入力され、訓練によって直ちに収束に至っており、すなわち、この回路は試料間の識別が可能であった。

【0049】

実施例2

これらの試験では、8つのビオチン化レクチン：タチナタマメ、バンデイラエア・シンプリシフォリア (Bandeiraea simplicifolia) BS-1、ラッカセイ、アメリカヤマゴボウ、インゲンマメpha-e、コパラミツ (artocarpus integrifolia)、トリティカム・ブルガリス (Triticum vulgaris)、エンドウからなる同じアレイを用いて、罹患したヒトおよび健常者の血清試料を対比させて分析した。この場合には、パターン成形されていない金 (

10

20

30

40

50

スパッタリングによって50nm厚の金を蒸着した)でコーティングされたガラス(0.3mm厚のガラス)の表面を、本質的には上記の通りおよびアミノ-ビオチンのカップリングを含めて調製した。続いて、この表面をファルマシアバイオセンサー(Pharmacia Biosensor)社のBIAcoreに挿入した。泳動条件は2μl/分、25とし、泳動緩衝液はHBSTとした。SAとビオチン化レクチンとの結合は、50μg/ml溶液をそれぞれ4μl、連続的に注入することによって行った。

【0050】

ヒト血清はルンド(Lunds)大学病院の感染症科(Infectious Diseases Department)から入手した。参考用血清は健康志願者から採取した(20人)。罹患者の血清試料(8人)はすべて臨床的な細菌感染症を有することが同定された。血清はHBSTで4:1に希釈し、30μlを注入した。注入が完了した後に、参考用ユニット(RU)における値を求めた。再生用溶液を注入することによって表面をビオチンに関して再生した。続いて、次の結合試験を開始するために、SAおよびビオチン化レクチンを連続的に注入した。血清試料のすべてが8種のレクチンすべてによって分析されるまで、この過程を繰り返した。このような1つの実験の結果を図4に示す。健常者の参考用血清試料との比較により、8人の罹患者のうち7人が罹患していることが明らかに同定された。

【0051】

本発明者らは当初、これらの試験に関する抗体の使用を企図した。しかし、本発明者らは、親和性および特異性の適切な組み合わせを有するモノクローナル抗体を見いだすことができなかった。これは、これらの抗体を選択するために用いたスクリーニング手順、または広範な交差反応性を持つ抗体が抑制されたためであった可能性がある。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1a】8カ所の検出領域を用いる固定化手順の模式図。

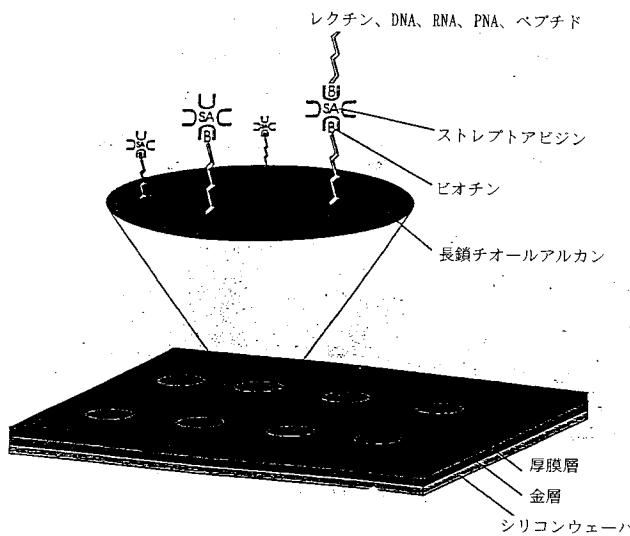
【図1b】2×96カ所の検出部を用いる固定化手順の模式図。

【図2】固定角走査型円二色計の模式図。

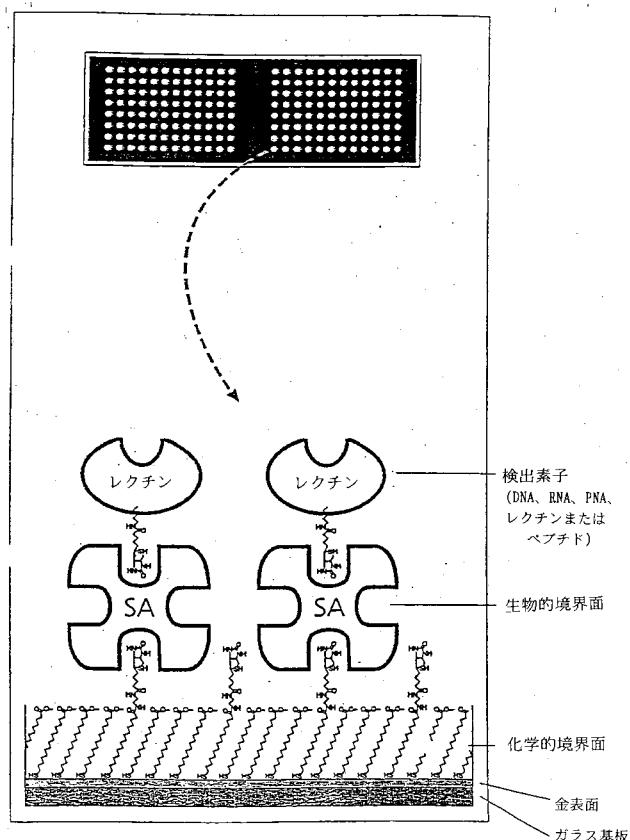
【図3】動物血清反応のチャート。

【図4】健常者と罹患者の反応を対比させたチャート

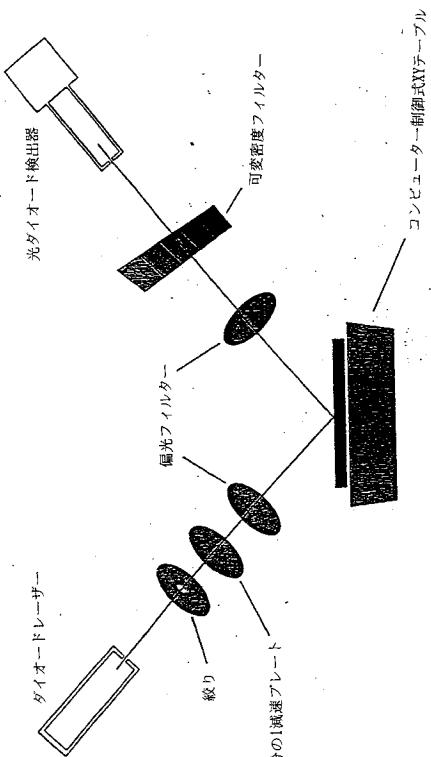
【図1a】



【図1b】

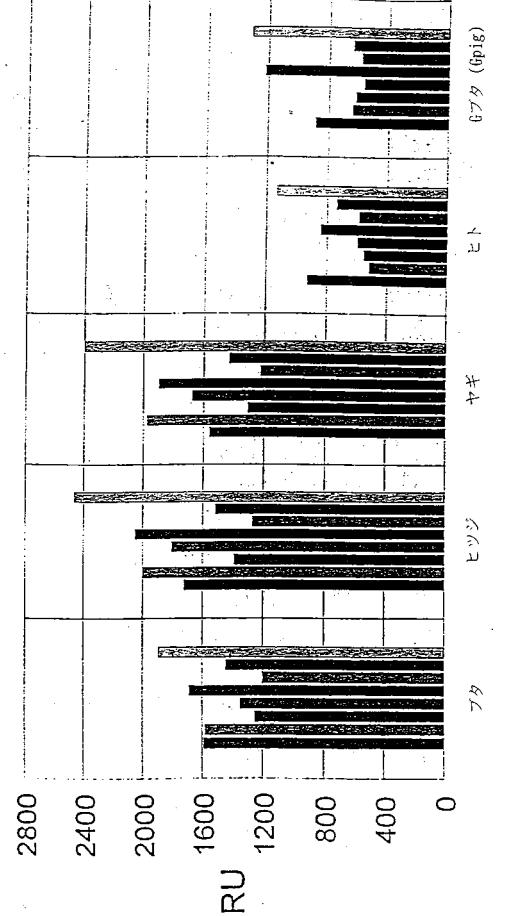


【図2】

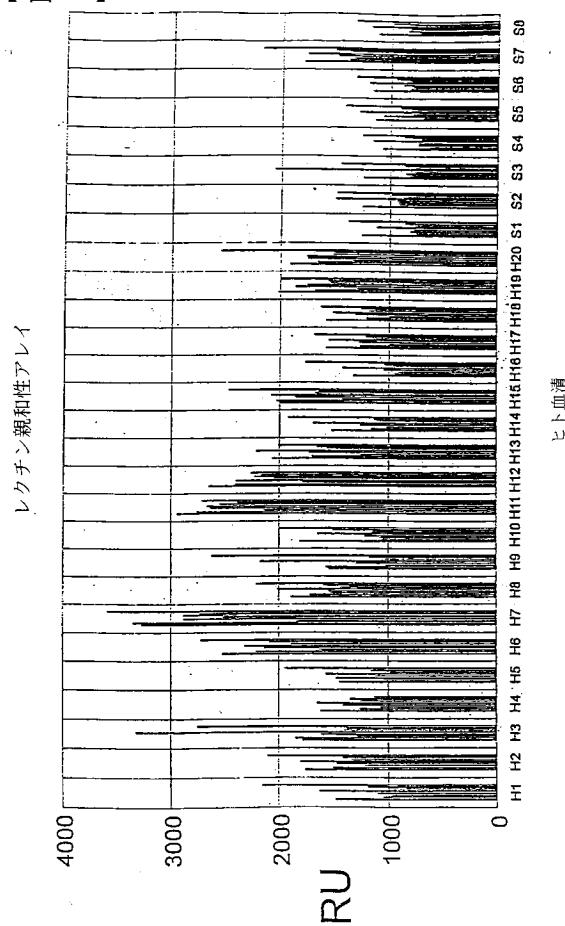


走査型円二色計の模式図

【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 12 M 1/00 (2006.01)	G 01 N 33/543	5 2 5 U
	G 01 N 33/547	
	G 01 N 33/545	Z
	G 01 N 33/543	5 9 3
	G 01 N 33/543	5 9 5
	C 12 M 1/00	A

专利名称(译)	具有广泛特异性的亲和阵列：用于鉴定复杂样品的定量方法		
公开(公告)号	JP2006349690A	公开(公告)日	2006-12-28
申请号	JP2006200601	申请日	2006-07-24
[标]申请(专利权)人(译)	主要克伦迈克尔·伯格		
申请(专利权)人(译)	迈克尔·梅克伦堡		
[标]发明人	メクレンブルグミカエル ダニエルソンベン ワインケストフレデリック		
发明人	メクレンブルグミカエル ダニエルソンベン ワインケストフレデリック		
IPC分类号	G01N37/00 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/547 G01N33/545 C12M1/00 C12N15/09 C40B40/06 C40B40/10		
CPC分类号	G01N33/54373 B01J2219/00527 B01J2219/00585 B01J2219/00596 B01J2219/00605 B01J2219/0061 B01J2219/00612 B01J2219/0063 B01J2219/00637 B01J2219/00659 B01J2219/00707 B01J2219 /00722 B01J2219/00725 B01J2219/00729 C40B40/06 C40B40/10 Y10S435/808 Y10S435/96 Y10S435 /969 Y10S435/973 Y10S436/809		
FI分类号	G01N37/00.102 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/53.U G01N33/53.V G01N33/543.525.U G01N33 /547 G01N33/545.Z G01N33/543.593 G01N33/543.595 C12M1/00.A B82Y35/00		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/FA12		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	9602545 1996-06-25 SE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种使用固定在固体支持物上的离散生物检测元件阵列鉴定复杂生物样品的方法。通过测量其表面质量的增加，可以直接确定绑定到传感器阵列的组件，并使用神经网络或基于统计的模式识别方法进行数据分析。在一个优选的实施方案中，样品在特殊条件下与传感器阵列接触，以去除未结合的样品组分，确定表面上的质量增益，并使用模式识别软件来参考质量增益数据和参考。通过与标准品比较，测量液体样品中是否存在可溶性成分。[选择图]无

