

(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2009-128233

(P2009-128233A)

(43) 公開日 平成21年6月11日(2009.6.11)

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

F I

G01N 33/543 501Z

G01N 33/543 541A

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2007-304656 (P2007-304656)
 (22) 出願日 平成19年11月26日 (2007.11.26)

(71) 出願人 000001007
 キヤノン株式会社
 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
 (74) 代理人 100123788
 弁理士 官崎 昭夫
 (74) 代理人 100106138
 弁理士 石橋 政幸
 (74) 代理人 100127454
 弁理士 緒方 雅昭
 (72) 発明者 来栖 史代
 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キ
 ヤノン株式会社内
 (72) 発明者 小川 美紀
 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キ
 ヤノン株式会社内

最終頁に続く

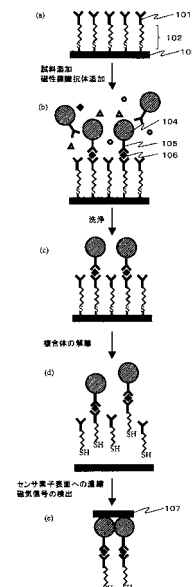
(54) 【発明の名称】 標的物質の検出方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 検体由来の物質や標識物質などによる非特異吸着の影響を受けず、かつセンサ素子を大きくすることなく、感度および精度に優れた検体液中の標的物質の検出方法を提供する。

【解決手段】 第一の特異結合物質が固定されている大面積を有する固相に、第二の特異結合物質と標識物質とを有する標識試薬と、前記検体液とを接触させることにより、前記標的物質に前記第一の特異結合物質および第二の特異結合物質が結合した複合体を前記固相上に形成する工程と、未反応の標的物質を含む過剰な検体液由来の物質や過剰な前記標識試薬を前記固相上から除去するための洗浄工程と、前記選択的に開裂する結合を開裂する手段により前記複合体を前記固相から解離させる工程と、前記解離させた複合体を、前記固相に比べて小面積の検出部位上に濃縮する工程と、前記検出部位上に濃縮された前記複合体の濃度を測定する工程と、を有することを特徴とする標的物質の検出方法。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

検体液中の標的物質を検出するための方法であって、
選択的に開裂する結合を介して第一の特異結合物質が固定されている、大面積を有する分離用固相に、第二の特異結合物質と標識物質とを有する標識試薬と、前記検体液とを接触させることにより、前記標的物質に前記第一の特異結合物質および第二の特異結合物質が結合した複合体を前記固相上に形成する工程と、
未反応の標的物質を含む過剰な検体液由来の物質や過剰な前記標識試薬を前記固相上から除去するための洗浄工程と、
前記選択的に開裂する結合を開裂する手段により前記複合体を前記固相から解離させる工程と、
前記解離させた複合体を、前記固相に比べて小面積の検出部位上に濃縮する工程と、
前記検出部位上に濃縮された前記複合体の濃度を測定する工程と、
を有することを特徴とする標的物質の検出方法。

10

【請求項 2】

前記標識物質が磁性粒子であることを特徴とする請求項 1 記載の検出方法。

【請求項 3】

前記検出部位上への前記複合体の濃縮を磁場の印加で行うことを特徴とする請求項 1 または 2 記載の検出方法。

【請求項 4】

前記検出部位上に濃縮された前記複合体の濃度の測定を磁気信号の検出により行うことを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれかに記載の検出方法。

20

【請求項 5】

前記選択的に開裂する結合がチオレート結合であることを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の検出方法。

【請求項 6】

前記結合を選択的に開裂する手段が電位の印加であることを特徴とする請求項 5 記載の検出方法。

【請求項 7】

前記選択的に開裂する結合が特定のアミノ酸配列であることを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の検出方法。

30

【請求項 8】

前記結合を選択的に開裂する手段が基質特異性が高いプロテアーゼであることを特徴とする請求項 7 記載の検出方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、臨床検査、獣医検査、食品検査、環境検査などの様々な分野で利用される、検体液中の標的物質を検出する方法に関するものである。本発明は特に、臨床検査の分野において診断と治療に不可欠な、検体液中の標的物質の検出に好適に応用できる検出方法に関する。

40

【背景技術】**【0002】**

検体液中に含まれる抗原、抗体、DNAなどの生体成分の検出は、感染症や癌などの疾病の診断や治療に広く用いられており、临床上、非常に重要である。

【0003】

標的物質を検出するための方法としては、標的物質と特異的に結合する物質で被覆された不溶性の担体（固相）を用いて標的物質を捕捉して測定する方法、いわゆる固相測定法が広く用いられている。固相測定法は、競合法と非競合法（サンドイッチ法）に大別されるが、測定感度の点においてはサンドイッチ法が優れている。サンドイッチ法では、標的

50

物質の二つの異なる領域での結合が形成されるが、まず標的物質の一方の領域（標的物質が抗原の場合はエピトープと呼ばれる）を特異的に認識し捕捉することができる第一の特異結合物質を固相上に固定する。標的抗原を抗体を用いて捕捉する場合には、第一の特異結合物質は一次抗体と呼ばれる。次に、この固相表面に、標的物質を含む検体液を接触させる。これにより、標的物質が第一の特異結合物質に捕捉される。次に、第一の特異結合物質により捕捉された標的物質の他方の領域を特異的に認識し、捕捉することができる第二の特異結合物質を有する標識物質を添加する。標的抗原を抗体を用いて捕捉する場合には、第二の特異結合物質は二次抗体と呼ばれる。これにより、第二の特異結合物質を有する標識物質が、固相表面に固定化された第一の特異結合物質に捕捉された標的物質に捕捉され、結果的に図1(c)のように、標的物質を介して標識物質が固相表面に固定化される。

10

【0004】

また、あらかじめ標的物質を含む検体液中に、第二の特異結合物質を有する標識物質を加えて、“標的物質 - 第二の特異結合物質”複合体を形成させる。この複合体を固相上に固定化された第一の特異結合物質と接触させることによっても、図1(c)のように標的物質を介して、標識物質を固相表面に固定化できる。

【0005】

固相測定法における感度を向上させるために、表面積が大きな粒子状の固相を用いて第一の特異結合物質の濃度を増大させる手法が一般的に用いられており、市販の免疫検査装置においては固相として磁性粒子が利用されているものもある。

20

【0006】

近年、磁性粒子を固相としてではなく、標識物質として用いて標的物質濃度を測定する磁気バイオセンサが注目されている。磁気測定においては、バックグラウンドノイズの発生源が磁性体のみであるため、光学測定や電気化学測定と比較して、外部からのバックグラウンドノイズが低く、高感度検出に有用な手法である。

【0007】

磁気測定の手法を用いた標的物質の検出方法として、特許文献1には、センサ素子上の第一の特異結合物質と磁性粒子を標識した第二の特異結合物質との標的物質を介した結合により、素子表面に保持される磁性粒子の磁気信号を、巨大磁気抵抗効果素子を用いて検出する方法が開示されている。

30

【0008】

また、特許文献2には、センサ素子上の第一の特異結合物質と磁性粒子を標識した第二の特異結合物質との標的物質を介した結合により、素子表面に保持される磁性粒子の磁気信号を、半導体磁気抵抗効果素子を用いて検出する方法が開示されている。

【0009】

さらに、特許文献3および特許文献4では、標的物質とその特異結合物質（修飾あるいは標識された特異結合物質を含む）との複合体を第一固相に形成させた後、該複合体を溶出して第二固相に移しかえ、第二固相上の該複合体を測定して標的物質を定量することで、非特異吸着の影響を低減させている。しかしながら、該複合体を溶出させるための手段として、酸、アルカリ、高濃度無機塩等の試薬の添加が開示されている。

40

【特許文献1】米国特許第598197号明細書

【特許文献2】特開2005-84023号公報

【特許文献3】特許第2606722号公報

【特許文献4】特許第2657672号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

検体液中における標的物質は微量しか含まれていない、あるいは疾病の早期発見や再発防止のために微量での検出が必要とされる場合が多く、さらなる高感度および高精度での検出が望まれている。微量の標的物質を高感度に検出するためには、前述のように固相面

50

積を増大させて第一の特異結合物質の固定量を増加させる必要があるが、非特異吸着量も増加し、高感度検出を妨害する。

【0011】

特許文献1および2に開示される磁気バイオセンサにおいて、さらなる高感度化のために固相面積を増大させて第一の特異結合物質の固定量を増加させようとする、固相がセンサ素子であるため、コストの上昇に直結してしまう。また、夾雑物質からの磁気信号ノイズはなくとも、第二の特異結合物質に標識された磁性粒子のセンサ素子表面への非特異吸着による高感度検出の妨害に対する対策が不可欠である。

【0012】

また、特許文献3および4に開示される方法では、非特異吸着量を低減させることで高感度検出を可能とすることを目的とするが、標的物質の変性や、非特異吸着物質の解離、解離条件の至適化の煩雑さという問題があった。

10

【0013】

本発明は、上記課題点を克服するものであり、検体由来の物質や標識物質などによる非特異吸着の影響を受けず、かつセンサ素子を大きくすることなく、感度および精度に優れた検体液中の標的物質の検出方法を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明に係る検出方法は、
 選択的に開裂する結合を介して第一の特異結合物質が固定されている、大面積を有する分離用固相に、第二の特異結合物質と標識物質とを有する標識試薬と、前記検体液とを接触させることにより、前記標的物質に前記第一の特異結合物質および第二の特異結合物質が結合した複合体を前記固相上に形成する工程と、
 未反応の標的物質を含む過剰な検体液由来の物質や過剰な前記標識試薬を前記固相上から除去するための洗浄工程と、
 前記選択的に開裂する結合を開裂する手段により前記複合体を前記固相から解離させる工程と、
 前記解離させた複合体を、前記固相に比べて小面積の検出部位上に濃縮する工程と、
 前記検出部位上に濃縮された前記複合体の濃度を測定する工程と、
 を有することを特徴とする標的物質の検出方法である。

20

30

【発明の効果】

【0015】

本発明は、検体中の標的物質を分離用固相上で捕捉した後にセンサ素子上に濃縮することによって、標的物質をセンサ素子上で捕捉することにより検出する方法では検出できなかった微量の標的物質を測定することを可能とする。そして、検体からの標的物質の濃縮工程において、標的物質のみを濃縮することができるため、非特異的吸着の影響を受けずに標的物質を検出することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明は、検出部位上の標識物質の数を検知することにより検体液中の標的物質の濃度を測定する方法である。標的物質とその特異結合物質との複合体を選択的に解離させることが可能な結合を介して大面積の固相上に形成させた後に、複合体を選択的に解離させ、小面積の検出部位上に濃縮して測定することにより、非特異吸着の影響を低減して高感度に標的物質の定量を行うことができる。

40

【0017】

具体的には次の工程を有する。

(1) 選択的に開裂する結合を介して第一の特異結合物質が固定されている大面積を有する固相に、第二の特異結合物質と標識物質とを有する標識試薬と、前記検体液とを接触させることにより、前記標的物質に前記第一の特異結合物質および第二の特異結合物質が結合した複合体を前記固相上に形成する工程。

50

(2) 未反応の標的物質を含む過剰な検体液由来の物質や過剰な前記標識試薬を前記固相上から除去するための洗浄工程。

(3) 前記選択的に開裂する結合を開裂する手段により前記複合体を前記固相から解離させる工程。

(4) 前記解離させた複合体を、前記固相と比べて小面積の検出部位上に濃縮する工程。

(5) 前記検出部位上に濃縮された前記複合体の濃度を測定する工程。

(1)の工程は、検体液中の標的物質を検体液から分離する工程と、標的物質を標識する工程とを有しており、これらを独立して行ってもよい。大面積を有する固相には、標的物質と特異的に結合する特異結合物質(以下、第一の特異結合物質と記す)が選択的に開裂する結合を介して固定されている。標識試薬は、と第一の特異結合物質とは異なる領域で標的物質と結合する特異結合物質(以下、第二の特異結合物質と記す)に標識物質が結合したものをを用いる。

10

【0018】

本発明の好ましい実施の形態について、詳細に説明する。

【0019】

(標的物質)

本発明における標的物質は、特異結合物質が存在する全ての物質である。よって標的物質は、生体物質に限るものではなく、またその大きさも限定されるものではない。ただし、標的物質は抗原や擬似抗原、抗体、ホルモン、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖、ビタミン、遺伝子、薬剤などの生物に含有される生体物質、および、その関連物質や人工的に合成された擬似生体物質であることが望ましい。

20

【0020】

これらの標的物質は全血、血清、血漿、髄液、唾液、尿、涙液、汗、間質液などの体液、糞便、組織抽出液などに含まれる場合が多い。これらの標的物質を含む試料をそのまま検体液として使用しても、試料に対して、標的物質の抽出処理、分離処理、希釈処理および精製処理等の各種処理を経て調整されたものを使用しても良い。

【0021】

(特異結合物質)

本発明における特異結合物質は、標的物質と特異的に結合する物質をいい、修飾あるいは標識されたものも含む。抗体、抗原、レセプター、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、レクチン、遺伝子、あるいはDNAやRNAなどが挙げられるがこれに限るものではない。また、特異結合物質は、特異結合能を有するそれらのフラグメントあるいはサブユニットも含む。サンドイッチ法により標的物質を固相に捕捉し、且つ標的物質を標識する場合は、特異結合物質は、固相に固定したもの(第一の特異結合物質)と標識物質と結合したもの(第二の特異結合物質)の2種類を用いる。

30

【0022】

(標的物質を分離するために用いる固相)

本発明に用いる固相は、本発明の検出方法において検体から標的物質を選択的に分離するために特異的結合物質を固定して用いる固相担体である。この標的物質分離用の固相は、選択的に開裂できる結合を表面に導入でき、検出部位よりも大面積のものであれば、従来の固相測定法で使用されてきたものでも、あるいは新しいものでもよく、材質、形状、大きさなどによって限定されるものではない。固相の面積は検出部位の2倍以上であることが好ましい。分離用固相の例としては、ポリスチレン球、ナイロン球、ガラス球、ガラス平板、ポリスチレンマイクロプレート、ラテックス粒子、各種磁性粒子、金属粒子、金属で被覆された粒子、金属平板、金属で被覆された平板、各種多孔質体、各種電極などが挙げられるがこれに限るものではない。選択的に開裂できる結合としてチオレート結合を用いる場合には、材質として金、銀、銅、白金、パラジウム、鉄などの金属や、ITOなどの酸化物、GaAsやInPなどの半導体を含む固相を使用するのが望ましい。

40

【0023】

(標識物質)

50

本発明に用いる標識物質は、標的物質を検出するための標識としての物性や特性を満たすものであればよく、通常用いられる、磁性物質、酵素、放射性同位体、蛍光物質、発光物質などがあげられる。

【0024】

磁性物質としては、磁場の印加により磁気信号を検出できるものであれば良く、常磁性、超常磁性を示す磁性粒子などを用いることができる。磁性粒子としては、フェライトやマグネタイトといった鉄酸化物や金属酸化物の粒子を利用できる。また、これらの粒子や高分子材料中にこれらの粒子を封入あるいは分散させたものをコアとして、高分子層を被覆した被覆物も用いることができる。磁性粒子の大きさは検出素子の形状、大きさ、あるいは用途によって様々に選択することが可能であるが、一般的に数十ナノメートルから数百マイクロメートルの直径を有するものが用いられる。ただし、特異結合物質の固定量を増加させるために粒径が小さく、かつ磁力による濃縮や洗浄および磁気信号の検出を行うために飽和磁化の高いものが望ましい。

10

【0025】

酵素としては、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ等が一般的に用いられる。

【0026】

放射性同位体に用いられるものとしては、例えば、 ^{135}I 、 ^{125}I があげられる。

【0027】

蛍光物質としては、フルオレセイン系、シアニン系、ローダミン系等の物質を用いることができる。

20

【0028】

発光物質としては、アクリジニウム系およびルミノール系の物質、金コロイドのようなコロイド金属などが一般的に用いられる。

【0029】

(固相上への特異結合物質の固定)

本発明の検出方法においては、特異結合物質を選択的に開裂する結合を介して固相上に固定する。選択的に開裂する結合は、標的物質と特異結合物質(標識されたものを含む)との複合体を変性させずに、非特異吸着物質と比較して複合体を選択的に解離できるものであれば良く、チオール基やジスルフィド基、あるいは特定のアミノ酸配列を有する化合物などを用いることにより形成することができる。

30

【0030】

例えば、チオール基あるいはジスルフィド基を有する化合物を所定濃度溶解させた溶液中に、金などの固相を所定時間浸漬することにより、固相表面にチオレート結合を介してこれらの化合物が結合する。チオレート結合は後述するように、固相に所定の電位を印加することにより、選択的に解離させることができる。これらの化合物のもう一方の末端に、活性エステル基、カルボキシル基、アミノ基などの官能基を有するものを用い、これらの官能基を利用して特異結合物質を固定することができる。これらの化合物は、固相と結合するチオール基あるいはジスルフィド基と、特異結合物質と結合する官能基間の分子構造や長さなどは限定されるものではない。ただし、炭素数が数個~数十個のアルキル鎖やエチレンオキシドユニット数が数個~数十個のポリエチレンオキシド鎖が一般的に用いられる。

40

【0031】

特定のアミノ酸配列を有する化合物としては、

Ile-Glu-Gly-Arg(配列番号1)、Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro(配列番号2)、Asp-Asp-Asp-Lys(配列番号3)、Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser(配列番号4)などのアミノ酸配列を有するペプチドなどを利用できる。例えば、これらのアミノ酸配列を有するペプチドを導入した特異結合物質を含む溶液中に固相を浸漬することにより、得意結合物質を固相上に結合させることができる。これらのアミノ酸配列は、後述するように、基質特異性に優れたプロテアーゼにより選択的に切断することができる。

50

【0032】

(標的物質と特異結合物質との複合体の固相からの解離)

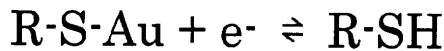
本発明の検出方法において、固相上に選択的に開裂が可能な結合を介して形成された、標的物質と特異結合物質(標識されたものを含む)との複合体を、変性させることなく、かつ選択的に解離することにより、固相上に非特異的に吸着した標識体などの影響を低減することができる。

【0033】

解離方法としては、チオレート結合が形成されている場合には、固相に対して、銀/塩化銀などの電極を基準として一定の負電位を印加あるいは一定範囲の電位を挿引することにより、還元脱離反応が起こり、チオレート結合を選択的に解離させることができる。例えばチオール基を持つ化合物(R-SH)を金の固相上に結合させた場合は、

10

【化1】



という反応が起こる。チオレート結合を解離させるためには、一定の電位を所定時間印加しても良いし、所定範囲の電位を所定の速度で挿引しても良い。電極還元だけでなく、プロトンの付加によっても、チオレート結合は解離するため、溶液のpHは低い方がより狭い電位範囲での挿引で脱離させることが可能になる。したがって、印加する電位の値、あるいは挿引する電位の範囲の最適値は用いる化合物や溶液のpHにより異なるが、pH 3からpH 10の溶液中で、銀/塩化銀電極に対して-0.2Vから-1.0Vの電位範囲で、数十mV/sから数百mV/sの速度で挿引を行えば、チオレート結合を解離させることが可能である。

20

【0034】

特定のアミノ酸配列を有する化合物を用いた場合には、基質特異性に優れたプロテアーゼを作用させることにより選択的に切断することができる。例えば、Ile-Glu-Gly-Arg(配列番号1)の配列を含む化合物の場合にはXa因子(メルク社製品)を、Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro(配列番号2)の配列を含む場合にはHRV 3C Protease(タカラバイオ社製品)、Asp-Asp-Asp-Asp-Lys(配列番号3)の配列を含む場合にはエンテロキナーゼ(メルク社製品)を、Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser(配列番号4)の配列を含む場合にはトロンピン(メルク社製品)を含む溶液中に固相を浸漬させることにより、選択的に配列が切断される。

30

【0035】

(検出部位上への標識物質の濃縮)

本発明の検出方法においては、大表面積の固相上に固定した標的物質と特異結合物質との複合体を、選択的に解離させた後、小面積の検出部位に濃縮して検出を行うことで、感度を向上させることができる。濃縮とは、特異結合物質を介して結合した標的物質の単位面積あたりにおける存在量が、大表面積の分離用固相上に比べ、検出部位上の方が増加することをいう。濃縮の手段は、検出部位への標識物質の濃縮が達成されるものであればよく、磁場の印加、電場の印加、静電相互作用、疎水性相互作用などを利用することができる。標識物質として磁性粒子を用いた場合には、磁場の印加により検出部位上への濃縮が容易に行うことができる。また磁性粒子がセンサ素子表面に直接結合することによる、磁気信号強度の増加の効果を併せて得ることができ、好ましい。磁性粒子以外の酵素、放射性物質、蛍光物質、発光物質などの標識物質を、第二の特異結合物質と共に磁性粒子に結合させることで、磁場の印加により簡便に検出部位へ濃縮した後に、電気化学的、光学的手法により検出を行うことも可能である。

40

【0036】

ここで、固相への固定で行う特異結合物質と標的物質との結合は、様々な物質が存在する反応系から標的物質のみを特異的に選択する反応である。例えば、特異結合物質として抗体を用いる場合は抗原との結合は平衡状態に達すると、反応系に存在する標的物質をすべて集めることはできない。しかし、検出部位への濃縮では、例えば、磁場の印加による

50

方法は磁性を有する物質であれば非選択的に集めることができるため、濃縮する目的の物質のみが存在する系においては好適に用いることができる。

【0037】

(検出方式)

本発明の検出方法において用いる検出方式は、標識物質あるいは標識物質由来の物質の数を検知することにより、検体液中の標的物質の濃度を測定する方法であればよい。標識物質が酵素の場合では、酵素反応により生じた生成物を電気化学的あるいは光学的な手法により検出することができる。標識物質が蛍光物質の場合には、標識物質から生じる蛍光強度を検出すればよく、標識物質が発光物質の場合には、発光強度を検出すれば良い。ただし、バックグラウンドノイズが低い磁気信号を検出する方式が好ましく、センサ素子として、磁気抵抗効果素子、ホール効果素子、磁気インピーダンス素子、コイル、超伝導量子干渉素子が望ましい。

10

【実施例】

【0038】

以下、実施例を用いてさらに詳細に本発明を説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

【0039】

(実施例1)

本実施例では、標識として磁性粒子、選択的に開裂する結合としてチオレート結合を用い、標的抗原であるhCG (human Chorionic gonadotropin; ヒト絨毛性ゴナドトロピン) の磁気センサによる検出を行う。

20

【0040】

(1) 磁性標識の作製

hCGを捕捉する2次抗体を有する磁性標識を作製する。磁性粒子 (nanomag (登録商標) -D, micromod社製品、平均粒径 250 nm) 表面のカルボキシル基を、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドおよびN-ヒドロキシスクシンイミドにより活性化し、2次抗体に存在するアミノ基とアミド結合を形成させることにより、磁性標識を作製する。

【0041】

(2) 分離用固相の作製

洗浄した金基板 (およそ1cm²) をジチオビス(スクシンイミジルウンデカノエート) (以下DSH、同仁化学社製品) を1 mM含むジオキサン溶液中に浸漬し、チオレート結合を介して基板表面をDSHで修飾する。

30

【0042】

ジオキサンで洗浄後、hCGを捕捉する1次抗体を100 mg/mLの濃度で含むリン酸緩衝液中に、DSHで修飾した金基板を浸漬することにより、DSH末端の活性エステル基と抗体のアミノ基間にアミド結合を形成させ、抗体を固定する。

【0043】

界面活性剤を含むリン酸緩衝液で洗浄後、0.1 M エタノールアミンを反応させ、残存する活性エステル基をブロッキングする。

40

【0044】

リン酸緩衝液で洗浄後、10 mg/mLの濃度でスキムミルクを含むリン酸緩衝液中に基板を浸漬し、DSHで修飾されていない金基板表面をブロッキングする。

【0045】

上記操作により図1(a)に示すような分離用固相を作製する。

【0046】

(3) hCGの捕捉

抗原(標的物質)であるhCGを含む検体および2次抗体を有する磁性標識を含むリン酸緩衝液中に分離用固相を浸漬し、図1(b)のように次抗体-hCG-2次抗体・磁性標識のサンドイッチ複合体を分離固相上に形成させる。その後、図1(c)のように未反応の検

50

体および磁性標識を界面活性剤を含むリン酸緩衝液で洗浄して除去する。

【0047】

(4) サンドイッチ複合体の選択的解離

サンドイッチ複合体を形成した分離用固相の金基板を作用極、参照極として銀/塩化銀電極、対極に白金線を用い、リン酸緩衝液中において、 -0.2 V から -0.8 V の電位範囲でリニアースweepボルタンメトリーを行う(電位挿引速度: 100 mV/s)。この操作により還元脱離反応が起こり、チオレート結合が選択的に解離する。

【0048】

(5) センサ素子上へのサンドイッチ複合体の濃縮

(4)の操作により分離用固相から解離させた、DSHに固定した1次抗体のうち、hCGを介して形成した磁性標識とのサンドイッチ複合体のみを、磁力により磁気センサ素子(およそ 1 mm^2)表面へ濃縮する。

【0049】

(6) hCGの検出

(5)の操作によりセンサ素子表面に濃縮したサンドイッチ複合体の磁性標識からの磁気信号を検出することによって、検体液中に含まれるhCGを定量する。

<測定時操作の説明>

以下に図2の本発明の測定システムのブロック図を用いて、測定操作について説明する。206のサンプリングプローブにより、201の標的抗原を含む検体を209の反応容器へ分注する。203の希釈液も同様にして209の反応容器へ分注する。209の反応容器内に設置された211の分離用固相上には、電位の印加により選択的に開裂可能なチオレート結合を介して、一次抗体が固定されている。202の磁性標識試薬も同様にして209の反応容器へ分注することにより、211の分離用固相上に標的抗原を介して、磁性標識が固定される。固相上への結合に関与しなかった標的抗原や磁性標識試薬等を含む溶液は、206のサンプリングプローブにより、209の反応容器内より205の廃液容器へ移送される。さらに、206のサンプリングプローブにより、204の洗浄液を209の反応容器内へ満たし、洗浄を行う。206のサンプリングプローブにより、209の反応容器内より205の廃液容器へ、使用された洗浄溶液は移送される。206のサンプリングプローブにより、203の希釈液を209の反応容器へ分注する。209の反応容器内に設置されている212の参照極と211の分離用固相間には、213のポテンシオスタットにより制御された電圧が、214のポテンシャルスイーパーにより、定められた範囲を一定速度で掃引される。210の対極は、212の参照極に過電流が流れ、電位のずれが生じることを防ぐ。電位の掃引により、211の分離用固相上に形成された一次抗体-標的抗原-磁性標識の複合体は選択的に解離する。この際、固相上に非特異的に吸着した磁性標識は固相上に留まっている。206のサンプリングプローブにより、203の希釈液を215の検出容器へ分注する。220の磁場発生装置により、216の磁気センサ素子に対して垂直に磁場を発生させる。221の磁気信号検出器により、初期値の測定を行う。選択的に解離した複合体を含む溶液を、206のサンプリングプローブにより209の反応容器から215の検出容器へ移送する。217の磁石が設置された218のアームを、219の直動ガイドにより、216の磁気センサ素子へ近付ける。216の磁気センサ素子に対して大面積の217の磁石を用いることで、216の磁気センサ素子に対して垂直で均一な磁界を発生させる。この操作により、216の磁気センサ素子上に一次抗体-標的抗原-磁性標識の複合体を濃縮して固定する。この際、テイパー型の検出容器を用いることで、216の磁気センサ素子以外への磁性標識の固定を防ぐ。217の磁石が設置された218のアームを、219の直動ガイドにより、216の磁気センサ素子から遠ざける。220の磁場発生装置により、一次抗体-標的抗原-磁性標識の複合体が固定された216の磁気センサ素子に対して垂直に磁場を発生させる。磁性標識より発生した磁気信号を、221の磁気信号検出器により測定する。既知濃度の標的抗原を用いてあらかじめ作成した検量線を基に、初期値と比較した磁気信号の変化量から、検体中の標的抗原濃度を算出する。

10

20

30

40

50

【0050】

(実施例2)

本実施例では、標識として発光物質、選択的に開裂する結合として基質特異性の高いプロテアーゼにより選択的に認識される配列を有する化合物を用い、標的抗原であるhCGを発光物質標識の計測による検出を行う。

【0051】

(1) 発光物質結合磁性粒子の作製

標識体である発光物質およびhCGを捕捉する2次抗体を有する磁性粒子を作製する。

【0052】

磁性粒子(nanomag(登録商標)-D, micromod社製品、平均粒径250nm)表面のカルボキシル基を、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドおよびN-ヒドロキシスクシンイミドにより活性化し、2次抗体に存在するアミノ基とアミド結合を形成させることにより、磁性粒子に2次抗体を結合する。発光物質としては、アクリジニウム誘導体を用いる。アクリジニウムNHSエステル(和光純薬製品)と2次抗体を結合させた磁性粒子をリン酸緩衝液中で混合し、2次抗体のアミノ基にアミド結合を介してアクリジニウムを結合させる。

10

【0053】

(2) 分離用固相の作製

(a) Cys-Gly-Gly-Gly-Ser-Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Lys(配列番号5)の配列を有する合成ペプチドを1mM含むリン酸緩衝液中に、洗浄した金基板(およそ1cm²)を浸漬し、Cysと金基板間にチオレート結合を形成させ、金基板表面を合成ペプチドで修飾する。

20

(b) hCGを捕捉する1次抗体を0.1mMの濃度で含むリン酸緩衝液中に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドおよびN-ヒドロキシスクシンイミドをそれぞれ0.1mMずつ添加し、抗体表面のカルボキシル基を活性化させる。ここに、(a)で作成した合成ペプチドで修飾した金基板を浸漬することにより、活性エステル基と合成ペプチドのLysのアミノ基間にアミド結合を形成させ、抗体を金基板上に固定する。

(c) 界面活性剤を含むリン酸緩衝液で洗浄後、0.1Mエタノールアミンを反応させ、残存する活性エステル基をブロッキングする。

(d) リン酸緩衝液で洗浄後、10mg/mLの濃度でスキムミルクを含むリン酸緩衝液中に基板を浸漬し、金基板表面をブロッキングする。

30

【0054】

上記操作により図3(a)に示すような分離用固相を作製する。

【0055】

(2) hCGの捕捉

抗原(標的物質)であるhCGを含む検体および2次抗体を有する磁性標識を含むリン酸緩衝液中に分離用固相を浸漬し、図3(b)のように次抗体-hCG-2次抗体・発光物質標識磁性粒子のサンドイッチ複合体を分離用固相上に形成させる。その後図3(c)のように未反応の検体および磁性標識を界面活性剤を含むリン酸緩衝液で洗浄して除去する。

【0056】

40

(3) サンドイッチ複合体の選択的解離

サンドイッチ複合体を形成した分離用固相を、Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser(配列番号4)の配列に対して高い特異性を持つトロンピンを含むリン酸緩衝液中に浸漬する。

【0057】

(4) 検出部位上へのサンドイッチ複合体の濃縮

(3)の操作により分離用固相から解離させた1次抗体のうち、hCGを介して形成した発光物質標識磁性粒子とのサンドイッチ複合体のみを、磁力により検出部位(およそ1mm²)表面へ濃縮する。

【0058】

(5) hCGの検出

50

(4)の操作により検出部位表面に濃縮したサンドイッチ複合体の発光物質標識からの発光強度を計測することによって、検体液中に含まれるhCGを定量する。

【0059】

<測定時操作の説明>

以下に図4の本発明の測定システムのブロック図を用いて、測定操作について説明する。407のサンプリングプローブにより、401の標的抗原を含む検体を410の反応容器へ分注する。404の希釈液も同様にして410の反応容器へ分注する。410の反応容器内に設置された411の分離用固相上には、基質特異性の高いプロテアーゼにより選択的に開裂可能なアミノ酸配列を介して、一次抗体が固定されている。402の発光物質標識抗体を結合させた磁性粒子試薬も同様にして410の反応容器へ分注することにより、411の分離用固相上に標的抗原を介して、発光物質標識が固定される。固相上への結合に関与しなかった標的抗原や発光物質標識抗体を結合させた磁性粒子試薬等を含む溶液は、407のサンプリングプローブにより、410の反応容器内より406の廃液容器へ移送される。さらに、407のサンプリングプローブにより、405の洗浄液を410の反応容器内へ満たし、洗浄を行う。407のサンプリングプローブにより、410の反応容器内より406の廃液容器へ、使用された洗浄溶液は移送される。407のサンプリングプローブにより、403のプロテアーゼ溶液を410の反応容器へ分注する。基質特異性の高いプロテアーゼが特定の配列を認識して切断することにより、411の分離用固相上に形成された一次抗体-標的抗原-発光物質標識抗体を結合させた磁性粒子の複合体は選択的に解離する。この際、固相上に非特異的に吸着した発光物質標識抗体を結合させた磁性粒子は固相上に留まっている。407のサンプリングプローブにより、404の希釈液を412の検出容器へ分注する。417の検出プローブにより検出された光学的な信号を、418の検出器により初期値の測定を行う。選択的に解離した複合体を含む溶液を、407のサンプリングプローブにより410の反応容器から412の検出容器へ移送する。414の磁石が設置された415のアームを、416の直動ガイドにより、413の検出部位へ近付ける。413の検出部位に対して大面積の414の磁石を用いることで、413の検出部位に対して垂直で均一な磁界を発生させる。この操作により、413の検出部位上に一次抗体-標的抗原-発光物質標識抗体を結合させた磁性粒子の複合体を濃縮して固定する。この際、テーパー型の検出容器を用いることで、413の検出部位以外への磁性粒子の固定を防ぐ。発光物質標識より発生した発光を、417の検出プローブにより検出し、418の検出器により測定する。既知濃度の標的抗原を用いてあらかじめ作成した検量線を基に、初期値と比較した発光強度の変化量から、検体中の標的抗原濃度を算出する。

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図1】(a)~(e)は、本発明の一実施形態にかかる検出方法の工程を示す図である。

【図2】本発明実施例1の測定システムのブロック図である。

【図3】(a)~(e)は、本発明の一実施形態にかかる検出方法の工程を示す図である。

【図4】本発明実施例2の測定システムのブロック図である。

【符号の説明】

【0061】

- 101 . 1次抗体
- 102 . チオレート結合
- 103 . 分離用固相
- 104 . 磁性標識
- 105 . 2次抗体
- 106 . 標的抗原
- 107 . 磁気センサ素子

10

20

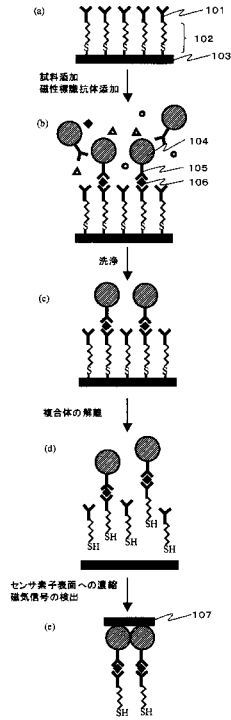
30

40

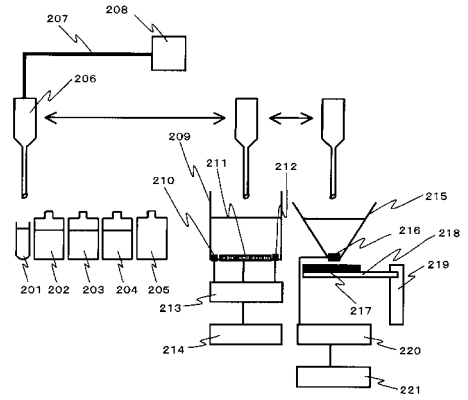
50

| | | |
|---------|----------------------------|----|
| 2 0 1 . | 検体液 | |
| 2 0 2 . | 磁性標識試薬 | |
| 2 0 3 . | 希釈液 | |
| 2 0 4 . | 洗浄液 | |
| 2 0 5 . | 廃液容器 | |
| 2 0 6 . | サンプリングプローブ | |
| 2 0 7 . | チューブ | |
| 2 0 8 . | ポンプ | |
| 2 0 9 . | 反応容器 | |
| 2 1 0 . | 対極 | 10 |
| 2 1 1 . | 分離用固相 | |
| 2 1 2 . | 参照極 | |
| 2 1 3 . | ポテンシオスタット | |
| 2 1 4 . | ポテンシャルスイーパー | |
| 2 1 5 . | 検出容器 | |
| 2 1 6 . | 磁気センサ素子 | |
| 2 1 7 . | 磁石 | |
| 2 1 8 . | アーム | |
| 2 1 9 . | 直動ガイド | |
| 2 2 0 . | 磁場発生装置 | 20 |
| 2 2 1 . | 磁気信号検出器 | |
| 3 0 1 . | 1次抗体 | |
| 3 0 2 . | プロテアーゼにより特異的に切断される配列を有する結合 | |
| 3 0 3 . | 分離用固相 | |
| 3 0 4 . | 磁性粒子 | |
| 3 0 5 . | 発光物質標識2次抗体 | |
| 3 0 6 . | 標的抗原 | |
| 3 0 7 . | 検出部位 | |
| 4 0 1 . | 検体液 | |
| 4 0 2 . | 発光物質標識抗体結合磁性粒子試薬 | 30 |
| 4 0 3 . | プロテアーゼ試薬 | |
| 4 0 4 . | 希釈液 | |
| 4 0 5 . | 洗浄液 | |
| 4 0 6 . | 廃液容器 | |
| 4 0 7 . | サンプリングプローブ | |
| 4 0 8 . | チューブ | |
| 4 0 9 . | ポンプ | |
| 4 1 0 . | 反応容器 | |
| 4 1 1 . | 分離用固相 | |
| 4 1 2 . | 検出容器 | 40 |
| 4 1 3 . | 検出部位 | |
| 4 1 4 . | 磁石 | |
| 4 1 5 . | アーム | |
| 4 1 6 . | 直動ガイド | |
| 4 1 7 . | 検出用プローブ | |
| 4 1 8 . | 検出器 | |

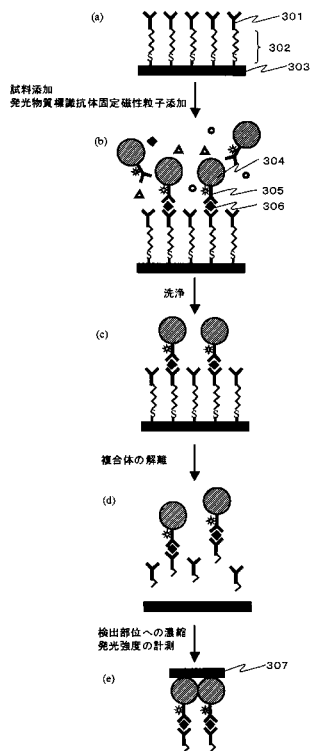
【 図 1 】



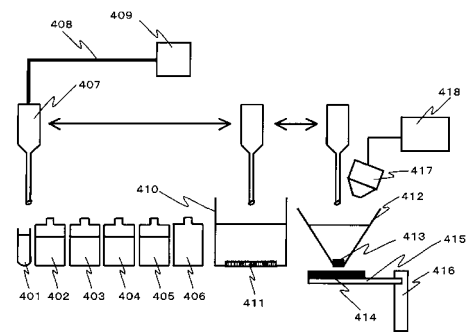
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【配列表】

2009128233000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 宇都宮 紀彦
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内