

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年6月24日(24.06.2010)

(10) 国際公開番号
WO 2010/071045 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/543 (2006.01) G01N 37/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/070485
- (22) 国際出願日: 2009年12月7日(07.12.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-324059 2008年12月19日(19.12.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 公立大学法人大阪府立大学(OSAKA PREFECTURE UNIVERSITY PUBLIC CORPORATION) [JP/JP]; 〒5998231 大阪府堺市中区学園町1-1 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 久本 秀明 (HISAMOTO, Hideaki) [JP/JP]; 〒5998231 大阪府堺市中区学園町1-1 公立大学法人大阪府立大学内 Osaka (JP). ヘナレス ギャバ テレンス (HENARES, Gaba Terence) [PH/US]; 11794 ニュー

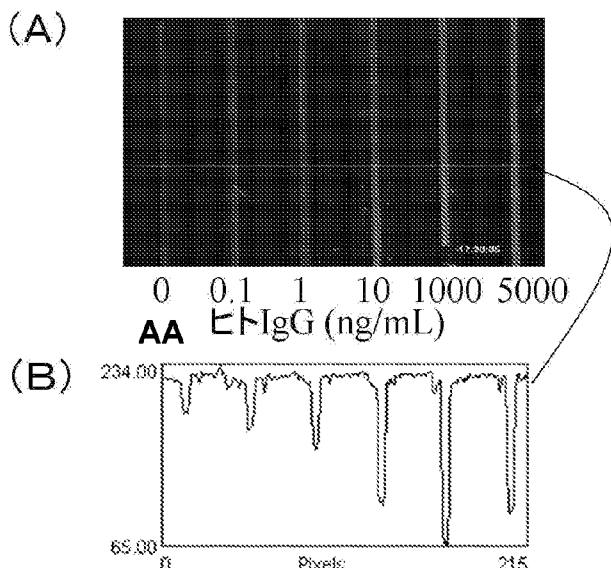
- ヨーク州、ストーニー ブルック、ヘルスサイエンス ドライブ 700、チャंपービー 1024エー New York (US).
- (74) 代理人: 野河 信太郎 (NOGAWA, Shintaro); 〒5300047 大阪府大阪市北区西天満5丁目1-3 南森町パークビル 野河特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, 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, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,

[続葉有]

(54) Title: CAPILLARY FOR IMMUNOASSAY, AND CAPILLARY IMMUNOASSAY METHOD USING SAME

(54) 発明の名称: イムノアッセイ用キャピラリー及びそれを用いたキャピラリーイムノアッセイ法

[図1]



AA HUMAN IgG (ng/mL)

(57) Abstract: Disclosed is a capillary for an immunoassay. In the capillary, an insoluble layer that comprises an oxidase conjugated to a first antibody is formed on an inner wall of the capillary, and a hydrophilic polymer layer that contains a second antibody conjugated to a peroxidase is formed on the insoluble layer, wherein the first antibody and the second antibody can bind to one and the same antigen.

(57) 要約: 本発明は、キャピラリーの内壁面に、第1抗体と結合したオキシダーゼからなる不溶性層が形成され、さらにその上に、ペルオキシダーゼと結合した第2抗体を含む親水性高分子の層が積層されてなり、前記第1抗体と前記第2抗体とが、同じ抗原に対して結合可能であるイムノアッセイ用キャピラリーを提供する。

WO 2010/071045 A1

GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類:
— 國際調查報告 (條約第 21 條(3))

明 細 書

発明の名称：

免疫アッセイ用キャピラリー及びそれを用いたキャピラリー免疫アッセイ法

技術分野

[0001] 本発明は、抗原－抗体反応により、試料を毛細管力で吸い上げるだけの1ステップで高感度に目的タンパク質を検出するための免疫アッセイ用キャピラリー及びそれを用いたキャピラリー免疫アッセイ法に関する。

背景技術

[0002] 試料中に含まれる目的タンパク質を、目的タンパク質と特異的に結合できる抗体を用いて、抗原－抗体反応を利用して測定する免疫アッセイが知られている。例えば、目的タンパク質に結合し得る1次抗体が結合したマイクロタイタープレート、磁性粒子などの担体に目的タンパク質を含む試料を添加し、目的タンパク質と1次抗体とを結合させた後、同じ目的タンパク質と結合し得る2次抗体をさらに目的タンパク質と結合させ、該2次抗体に結合した標識物質を検出することによるサンドイッチ免疫アッセイなどが汎用されている。

[0003] マイクロタイタープレートや磁性粒子を担体とする免疫アッセイは、数百 μ l程度の容量での測定が行われるので、目的タンパク質に対する抗体が大量に必要となる。すなわち、高価な抗体が大量に必要となり、しかも多種類の目的タンパク質を測定することも困難になる。また、目的タンパク質と各抗体との反応時間は通常数時間を要し、しかも多段階反応であるために溶液の入れ替えや洗浄作業などが極めて煩雑であり、さらに検出の感度もあまりよくないという問題点があった。

[0004] ガラス又はプラスチックからなるキャピラリーが流路の少なくとも一部分に埋設された微小流路デバイスが知られている（日本国特許第4073023号（特許文献1））が、このような微小流路デバイスに用いられるキャピ

ラリーは、免疫反応に用いることができることも知られている。

このような技術を利用して、近年、内壁が一辺100 μm 程度の角型キャピラリーの中で、抗原-抗体反応を行うキャピラリーイムノアッセイが開発されている（例えばHenares T.G.ら、Analytica Chimica Acta 589 (2007) p. 173-179（非特許文献1））。この技術は、内壁面に1次抗体を結合させたキャピラリーに、抗原溶液、酵素結合2次抗体及び基質溶液を順次流通させることにより、1次抗体と2次抗体とのサンドイッチイムノアッセイにより抗原の存在を検出するものである。

このような少量の測定系を用いることにより、必要とされる抗体の量を低減することが可能となった。

- [0005] しかし、この方法では、抗原溶液及び酵素結合2次抗体を流通させた後に、未結合の抗原及び酵素結合2次抗体を洗い流す洗浄操作が必要であり、これらの洗浄操作が、キャピラリーイムノアッセイを煩雑なものとしていた。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：日本国特許第4073023号公報

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Henares T.G.ら、Analytica Chimica Acta 589 (2007) p.173-179

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、従来のキャピラリーイムノアッセイに必要であった洗浄工程を行わずに、1工程で簡便、かつ短時間にイムノアッセイを行うためのキャピラリー及び方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0009] 本発明は、キャピラリーの内壁面に、第1抗体と結合したオキシダーゼからなる不溶性層が形成され、

さらにその上に、ペルオキシダーゼと結合した第2抗体を含む親水性高分子の層が積層されてなり、

前記第1抗体と前記第2抗体とが、同じ抗原に対して結合可能であるイムノアッセイ用キャピラリーを提供する。

本発明は、また、キャピラリーの内壁面を活性化処理し、活性化処理された内壁面へオキシダーゼを結合させ、前記オキシダーゼに第1抗体を結合させて不溶性層を形成し、さらにその上に、ペルオキシダーゼと結合した第2抗体を含む親水性高分子の層を積層する工程を含む、上記のイムノアッセイ用キャピラリーの製造方法も提供する。

[0010] 本発明は、さらに、上記のイムノアッセイ用キャピラリーに、前記オキシダーゼの基質と、前記ペルオキシダーゼに触媒されて検出可能になる色素と、過酸化水素捕捉剤とが添加された試料を導入する工程を含む、試料中での存在が疑われる目的タンパク質を検出するためのキャピラリーイムノアッセイ法も提供する。

本発明は、また、内部に分枝状又は格子状に流路が形成され、上記のイムノアッセイ用キャピラリーが前記流路の少なくとも一部に埋設されてなる微小流路デバイスも提供する。

発明の効果

[0011] 本発明のイムノアッセイ用キャピラリーを用いることにより、従来のキャピラリーを用いるイムノアッセイに必要であった洗浄工程が不要になり、1工程で簡便に、かつ迅速にイムノアッセイを行うことができる。また、非常に少量の反応系を用いることにより、反応時間を短縮でき、目的タンパク質のよりよい検出感度を実現できる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]実施例1において、本発明のイムノアッセイ用キャピラリーを用いて目的タンパク質を検出した場合の蛍光画像及びそれから得られた蛍光強度の測定結果を示す。

[図2]図1の蛍光強度の測定結果を、目的タンパク質の濃度に対してプロット

したグラフを示す。

[図3]本発明のイムノアッセイ用キャピラリーを含む微小流路デバイスのある実施形態を示す模式図である。

[図4]実施例2において、本発明のイムノアッセイ用キャピラリーを用いてHIV-1 (p24) 抗原を検出した場合の蛍光強度の測定結果を、目的タンパク質の濃度に対してプロットしたグラフを示す。

発明を実施するための形態

[0013] <イムノアッセイ用キャピラリー>

本発明のイムノアッセイ用キャピラリーは、抗原-抗体反応に基づいて目的タンパク質を検出及び測定するためのキャピラリーである。本明細書において、「抗原-抗体反応」とは、あるタンパク質と、該タンパク質を認識して特異的に結合する抗体との結合反応のことをいう。よって、「抗原」、すなわち目的タンパク質は、抗体に特異的に結合し得るタンパク質であればよく、抗体に結合することにより免疫原性を示す物質を必ずしも意図しないことが、当業者により認識される。

[0014] 本発明のイムノアッセイ用キャピラリー内で行われる抗原-抗体反応は、目的タンパク質に特異的に結合できる2種類の異なる抗体を用いて目的タンパク質の存在を検出する「サンドイッチ法」である。よって、本明細書における「第1抗体」及び「第2抗体」は、同じ抗原（目的タンパク質）に対して、異なる認識部位を介して結合可能である。「第1抗体」及び「第2抗体」は、それぞれオキシダーゼ又はペルオキシダーゼのいずれと結合するかにより、便宜的に「第1抗体」及び「第2抗体」というが、タンパク質のアミノ酸配列の並びとしては、どちらを「第1抗体」又は「第2抗体」に用いてもよいことが、当業者に認識される。

[0015] 本発明のイムノアッセイ用キャピラリーを用いて検出及び測定できる目的タンパク質は、該タンパク質に対する抗体を作製することができるタンパク質であればよく、特に限定されない。目的タンパク質としては、例えば、血液、尿、髄液、細胞破碎液などの試料中に存在し得る疾患の診断の指標とな

り得る疾患マーカータンパク質、有用な医薬品の探索における候補化合物などが挙げられる。

疾患マーカータンパク質としては、癌マーカー（例えば癌胎児抗原(CEA)、 α -フェトプロテイン(AFP)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)、塩基性フェトプロテイン(BFP)、扁平上皮癌関連抗原(SCC抗原)、BCA225、CA15-3、CA19-9、CA50、CA54/61、CA72-4、CA125、CA130、CA602、膵癌関連糖タンパク抗原(DUPAN-2)、KMO-1、NCC-ST-439、シアリルLex-i抗原(SLX)、サイトケラチン19フラグメント(CYFRA)、組織ポリペプチド抗原(TPA)、免疫抑制酸性タンパク質(IAP)、前立腺特異抗原(PSA)、神経特異エノラーゼ(NSE)、フェリチン、エラスターゼ1、p53抗体、ガストリン放出ペプチド前駆体(ProGRP)、前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)、 γ -セミノプロテイン(γ -Sm)、Dpyr、ポリアミン、BJPなど)、糖尿病マーカー（例えばインスリンなど）、肥満マーカー（例えばレプチン、アディポネクチンなど）、炎症マーカー（例えばC反応性タンパク質(CRP)など）、動脈硬化性疾患マーカー（例えばホモシステインなど）、腎機能マーカー（例えばシスタチンCなど）、HIVマーカー（p24抗原）、肝炎マーカー（HBs抗原、HBs抗体、HBe抗原、HBe抗体）などが挙げられる。また、種々の疾患のマーカーとして検査対象であることが知られているIgG、IgA、IgE、IgD、IgMなどの免疫グロブリンを目的タンパク質として検出及び測定することもできる。

[0016] <キャピラリー>

本発明のキャピラリーは、イムノアッセイにより発生する光（蛍光、可視光）又は色を透過し得る材料で構成されるものが好ましい。そのような材料としては、ガラス、及びポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリメタクリル酸メチル(PMMA)、ポリアクリル酸メチル、ポリジメチルシロキサン(PDMS)などのプラスチックが挙げられる。

[0017] 本発明のキャピラリーは、その横断面（長手方向に垂直な面）が方形、円形などのいずれの形状であってもよいが、イムノアッセイにより発生する光

又は色の検出がより容易である点で、正方形及び矩形を含む方形であることが好ましく、正方形であることがより好ましい。

キャピラリーが方形である場合、その外形の横断面の一辺は、 $200\mu\text{m}$ ～ 2mm が好ましく、より好ましくは $200\mu\text{m}$ ～ 1mm である。また、キャピラリーの内腔の横断面の一辺は、 $50\mu\text{m}$ ～ 1mm が好ましく、より好ましくは $50\mu\text{m}$ ～ $300\mu\text{m}$ である。

上記のキャピラリーは、市販されたものを用いることができる。例えば、外形の横断面が $300\mu\text{m}\times 300\mu\text{m}$ の正方形であり、内腔の横断面が $100\mu\text{m}\times 100\mu\text{m}$ の正方形であるガラス製キャピラリーとして、Square Flexible Fused Silica Capillary Tubing (Polymicro Technologies) が市販されている。

[0018] キャピラリーの長さは、測定される目的タンパク質の種類に応じて適宜選択できる。キャピラリーは、通常、 10cm ～ 1m 程度の長さで提供されるが、このような長さのキャピラリーに、以下に記載する不溶性層及び親水性高分子の層を形成した後に、所望の長さに切断してもよい。キャピラリーは、使用時には、反応容量が適切である点で、 $0.5\sim 5\text{mm}$ 、より好ましくは $0.5\sim 2\text{mm}$ 程度の長さであることが好ましい。

[0019] <不溶性層>

本発明のイムノアッセイ用キャピラリーの内壁面には、第1抗体と結合したオキシダーゼからなる不溶性層が形成されている。

本明細書において「不溶性層」とは、第1抗体と結合したオキシダーゼが、水と接触してもキャピラリーの内壁面との結合が解離しない、第1抗体と結合したオキシダーゼから形成される層のことをいう。

上記の不溶性層は、イムノアッセイ用キャピラリーの内壁面の少なくとも一部分に形成されていればよく、好ましくは該内壁面の全体に形成される。

[0020] キャピラリーの内壁面とオキシダーゼとの結合は、共有結合である。このような共有結合の形成方法は、それ自体公知である。例えば、ガラス又はプラスチックの表面を活性化処理し、タンパク質（オキシダーゼ）のアミノ酸

が有する官能基と適切な共有結合を形成させることにより行うことができる。ガラス又はプラスチックの活性化処理としては、アミノ基、メタクリル基、カルボキシル基、イソシアネート基、エポキシ基、アルデヒド基、SH基などの少なくとも1つの官能基を有する化合物による官能化が挙げられる。

[0021] 上記のオキシダーゼは、酸素を電子受容体として基質を酸化し、過酸化水素を発生する酵素であれば、特に限定されない。オキシダーゼは、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼ、グルタミン酸オキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、ピルビン酸オキシダーゼ、シュウ酸オキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、グリセロールオキシダーゼ、ヒスタミンオキシダーゼ、尿酸オキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼなどが挙げられる。その基質の入手が容易であるオキシダーゼが好ましく用いられ、グルコースオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼなどが好ましい。

[0022] 上記の第1抗体は、目的タンパク質に特異的に結合できる抗体であれば、特に限定されない。抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれであってもよい。抗体のクラスはIgG、IgMなどのいずれであってもよい。第1抗体は、目的タンパク質に対する結合能を有していれば、抗体のフラグメントであってもよい。抗体のフラグメントとしては、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、F(ab)₂フラグメント、sFvフラグメントなどが挙げられる。

抗体は、ヒト、マウス、ウサギ、ラット、ヤギ、ヒツジ、ニワトリなどのいずれの哺乳類及び鳥類に由来するものであってもよい。また、抗体は、組換え遺伝子工学により産生されたものであってもよい。

[0023] 第1抗体は、目的タンパク質に応じて、当該技術において公知の方法により得ることができる。例えば、第1抗体は、それ自体公知の方法を用いて作製したハイブリドーマから得ることができる。ハイブリドーマは、所望により適切なアジュバントと混合した抗原（目的タンパク質）で適切な哺乳動物（例えばマウス、ラットなど）を免疫する。そして、該動物の脾臓細胞、リ

ンパ節細胞、Bリンパ球などの抗体産生細胞を、適切な哺乳動物（例えばマウス、ラットなど）由来の骨髓腫細胞と融合させることにより得ることができる。通常、抗体産生細胞と骨髓腫細胞は、同種の動物に由来する。

細胞融合は、例えば適切な培地中で抗体産生細胞と骨髓腫細胞とをポリエチレングリコールなどの存在下で融合させるPEG法などにより行うことができる。細胞融合後、HAT培地などの選択培地でハイブリドーマを選択し、ハイブリドーマの目的タンパク質を認識する抗体を産生する能力について、常法（例えば酵素免疫測定法（EIA））に従ってスクリーニングを行う。次いで、目的タンパク質に結合可能な抗体を産生するハイブリドーマを常法（例えば限界希釈法）に従ってクローニングし、抗体を産生するハイブリドーマが選択される。そして、得られたハイブリドーマから、抗体を得ることができる。

[0024] また、第1抗体は、目的タンパク質に応じて、市販されている抗体を用いることもできる。

[0025] 第1抗体とオキシダーゼとは、直接的又は間接的に結合している。例えば、第1抗体とオキシダーゼとは、それらの間に介在する互いに特異的に結合する2種の結合性物質により結合するものであり得る。互いに特異的に結合する2種の結合性物質としては、ビオチンとストレプトアビジン又はアビジン、ハプテンと抗ハプテン抗体、ニッケルとヒスチジンタグ（His₆タグ）、グルタチオンとグルタチオン-S-トランスフェラーゼなどが挙げられる。ハプテンと抗ハプテン抗体としては、ジニトロフェノール(DNP)と抗DNP抗体、ビオチンと抗ビオチン抗体などが挙げられる。

[0026] 上記の2種の結合性物質は、そのいずれか一方をオキシダーゼに結合させ、他方を第1抗体に結合させることができる。結合性物質とオキシダーゼ又は第1抗体との間の結合の形成は、それ自体公知の方法（例えば、N-ヒドロキシスクインイミジル(NHS)基、マレイミド基などの反応性官能基と、アミノ酸のアミノ(NH₂)基、メルカプト(SH)基などとの間の共有結合、又は遺伝子工学的的手法による組換えタンパク質の発現)により行うことができる。この

ようにして得られる結合性物質が結合したオキシダーゼと、その対となる結合性物質が結合した第1抗体とを接触させることにより、オキシダーゼと第1抗体とを結合させることができる。

[0027] 第1抗体は、第1抗体の抗原認識部位が遮断されないように第1抗体を配向させてオキシダーゼに結合させることが好ましい。このような結合を可能にするために、上記の結合性物質の一方は、第1抗体の抗原認識部位以外の部分、好ましくはFcフラグメントに結合させることが好ましい。

[0028] 或いは、第1抗体とオキシダーゼとの間には、上記の結合性物質の代わりに、第1抗体配向物質を介在させることができる。第1抗体配向物質としては、抗体の抗原認識部位以外の部分、好ましくはFcフラグメントに特異的に結合できる物質が挙げられ、プロテインA、プロテインG、などが挙げられる。非特異的吸着が少ない点で、プロテインAが好ましい。

[0029] 第1抗体配向物質とオキシダーゼとの間の結合は、それ自体公知の方法により行うことができる。例えば、第1抗体配向物質がタンパク質である場合、第1抗体配向物質又はオキシダーゼのいずれか一方にNHS基、マレイミド基などの反応性官能基を導入し、他方のタンパク質のアミノ酸のアミノ基、メルカプト基などと共有結合を形成させることにより、第1抗体配向物質とオキシダーゼとを結合させ得る。また、アルデヒド基をオキシダーゼに導入し、該アルデヒド基と第1抗体配向物質のアミノ基、SH基との共有結合を形成させることにより、第1抗体配向物質とオキシダーゼとを結合させることもできる。

[0030] <親水性高分子の層>

本発明のキャピラリーは、上記の不溶性層の上に、ペルオキシダーゼと結合した第2抗体を含む親水性高分子の層が積層されている。

上記の親水性高分子は、水と接触して可溶化し得る高分子であれば特に限定されない。このような親水性高分子としては、ポリエチレングリコール、デキストラン、ヒドロキシエチルセルロースなどが挙げられる。

ポリエチレングリコールは、いずれの分子量のものであっても用いること

ができ、200～400万の分子量のものが挙げられる。中でも、取り扱いが容易である点で、2000～10万の分子量のものが好ましく、6000～5万の分子量のものがより好ましい。

- [0031] 親水性高分子の層は、親水性高分子を含む緩衝液で構成されるものが好ましい。該緩衝液は、親水性高分子の層に含まれるペルオキシダーゼ及び第2抗体に影響を与えないpHを維持できるものであれば特に限定されず、pH6～9を維持できる緩衝液が挙げられる。このような緩衝液としては、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、Tris-HCl緩衝液、HEPES緩衝液、ホウ酸緩衝液などを用いることができる。
- [0032] 親水性高分子がポリエチレングリコールである場合、上記の緩衝液中のポリエチレングリコールの濃度は、ポリエチレングリコールを含む緩衝液が不溶性層上に保持される粘度を有することとなる範囲であればよい。そのような動粘度としては、1000～2000 cStが好ましい。また、このような動粘度を与え得る緩衝液中のポリエチレングリコールの濃度としては、ポリエチレングリコールの分子量にもよるが、100～300 g/Lが好ましい。
- [0033] 親水性高分子の層に含まれる第2抗体に結合したペルオキシダーゼとしては、特に限定されず、植物、動物、微生物に由来する酵素及び遺伝子工学的手法により得られた組換え酵素のいずれを用いてもよい。生化学分野で多く用いられている点で、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)が好ましく用いられる。
- [0034] 親水性高分子の層に含まれるペルオキシダーゼと結合した第2抗体は、第1抗体が結合するのと同じ目的タンパク質に特異的に、抗原の異なる部位を介して結合するものであれば、特に限定されない。第2抗体のその他の性質及び作製方法については、第1抗体について述べたことと同じである。
- [0035] ペルオキシダーゼと第2抗体との結合は、それ自体公知の方法により行うことができる。例えば、ペルオキシダーゼをNHS基、マレイミド基などの反応性官能基で修飾し、これを第2抗体のアミノ酸のアミノ(NH₂)基、メルカプト(SH)基などと反応させることにより、ペルオキシダーゼを第2抗体に結合させ

ることができる。

特に、HRPが結合した抗体は、市販で入手可能である場合が多く、そのような市販のHRP標識抗体を本発明において第2抗体として用いることができる。

[0036] <イムノアッセイ用キャピラリーの製造方法>

本発明のイムノアッセイ用キャピラリーは、それ自体公知の方法を用いて作製できる。すなわち、イムノアッセイ用キャピラリーは、(1)キャピラリーの内壁面を活性化処理し、(2)活性化処理された内壁面へオキシダーゼを結合させ、(3)オキシダーゼに第1抗体を結合させて不溶性層を形成し、(4)さらに、形成された不溶性層の上に、ペルオキシダーゼと結合した第2抗体を含む親水性高分子の層を積層する工程を含む方法により得ることができる。これらの各工程の間には、適切な緩衝液を用いる洗浄工程を含み得る。

[0037] (1) キャピラリーの内壁面の活性化処理

キャピラリーの内壁面は、それ自体公知の方法に従って、上記のような官能基を有する化合物により活性化処理できる。

キャピラリー内壁面をアルデヒド基で活性化処理する場合、シランカップリング剤でキャピラリーの内壁面を処理し、乾燥させてアミノ基を導入し、このアミノ基をグルタルアルデヒドなどのアルデヒド基含有化合物と反応させてアルデヒド基を導入することにより、キャピラリーの内壁面を活性化処理できる。

シランカップリング剤としては、 γ -アミノプロピルトリメトキシシラン、3-アミノプロピルトリエトキシシランなどのアミノアルコキシシラン、3-グリシドキシプロピルトリメトキシシランなどのエポキシシラン、3-トリメトキシシリルプロピルメタクリレートなどのメタクリルシラン、(クロロメチル)トリエトキシシランなどのクロロアルキルシランなどが挙げられる。

なお、アルデヒド基で活性化処理されたキャピラリーの内壁面を、ポリエチレンイミン及びアルデヒド基含有化合物でさらに処理することにより、次

の工程におけるオキシダーゼの結合効率を向上させることができる。

また、キャピラリー内壁面をエポキシ基で活性化処理する場合、シランカップリング剤でキャピラリーの内壁面を処理し、乾燥させてエポキシ基を導入することにより、キャピラリーの内壁面を活性化処理できる。

[0038] (2) 活性化処理された内壁面へのオキシダーゼの結合

(1) の工程により活性化処理されたキャピラリーに、オキシダーゼを含む水溶液を導入し、適切な時間反応させることにより、キャピラリーの内壁面に共有結合を介してオキシダーゼを結合させることができる。

オキシダーゼを含む水溶液は、pHが8~9であることが好ましい。このようなpHとするために、適切な緩衝剤を用い得る。

水溶液中のオキシダーゼの濃度は、好ましくは3~5mg/mLである。

オキシダーゼを含む水溶液は、30分~2時間程度、25°C~40°Cの温度で反応させることが好ましい。

[0039] (3) オキシダーゼへの第1抗体の結合

(2) により得られたキャピラリーに、第1抗体を含む水溶液を導入して、適切な時間反応させることにより、オキシダーゼに第1抗体を結合させて、不溶性層を形成することができる。上記の第1抗体配向物質を用いる場合、第1抗体配向物質をオキシダーゼと結合させるための修飾剤をキャピラリーに導入し、次いで第1抗体配向物質を導入し、さらに第1抗体を導入することにより、オキシダーゼに第1抗体を結合させ得る。

第1抗体を含む水溶液は、pHが7~7.4であることが好ましい。このようなpHとするために、適切な緩衝剤を用い得る。

水溶液中の第1抗体の濃度は、好ましくは10~100μg/mLである。

第1抗体を含む水溶液は、第1抗体配向物質としてプロテインAを用いる場合、プロテインAをオキシダーゼと結合させた後に、30分~2時間程度、25°C~40°Cの温度で反応させることが好ましい。

[0040] 第1抗体を導入した後に、非特異的なタンパク質の吸着を抑制するために、ウシ血清アルブミン(BSA)、スキムミルクなどを導入して、コーティングを

行い得る。

[0041] (4) 親水性高分子の層の形成

(3) の工程に続いて、キャピラリーに、ペルオキシダーゼと結合した第2抗体を溶解した親水性高分子を連続的に導入することにより、親水性高分子の層を、キャピラリーの内壁面に形成された不溶性層の上に積層できる。

親水性高分子は、上記の適切な粘度を有するように上記の適切な緩衝液に溶解したものであってもよい。

親水性高分子中のペルオキシダーゼと結合した第2抗体の濃度は、好ましくは $10\sim 100\mu\text{g}/\text{mL}$ である。

親水性高分子をキャピラリーに連続的に導入する速度としては、数十 μl /分であることが好ましく、この範囲であれば、親水性高分子の層が良好に形成できる。

[0042] このようにして製造したイムノアッセイ用キャピラリーは、使用時まで冷却して($-20\sim 10^{\circ}\text{C}$)保存できる。

[0043] <キャピラリーイムノアッセイ法>

本発明は、上記のイムノアッセイ用キャピラリーを用いて、試料中での存在が疑われる目的タンパク質を検出することを含むキャピラリーイムノアッセイ法も提供する。

上記の試料は、目的タンパク質の存在が疑われる試料であれば特に限定されない。試料としては、血液、尿、髄液などの生体試料に由来する液体、細胞破碎液、水溶液などが挙げられる。

[0044] 本発明のイムノアッセイ法は、上記のイムノアッセイ用キャピラリーに試料を導入することにより行うことができる。試料の導入は、試料とキャピラリーの一端(試料導入口)とを接触させることにより、毛管現象により行うことができる。

キャピラリーに導入される試料は、キャピラリーの大きさにもよるが、通常、 $0.05\sim 0.1\mu\text{l}$ 程度である。

[0045] 導入された試料は、5分～1時間、より好ましくは10～30分間、20

～40℃、より好ましくは25～38℃の温度でキャピラリー中に保持して反応させることが好ましい。

[0046] 上記の試料には、上記のオキシダーゼの基質と、ペルオキシダーゼにより触媒されて検出可能になる色素と、過酸化水素捕捉剤とが添加される。

オキシダーゼの基質は、用いられるオキシダーゼの種類により適宜選択される。

オキシダーゼの基質は、その種類にもよるが、通常、10～50mMの濃度になるように試料に添加されるのが好ましい。

[0047] ペルオキシダーゼにより触媒されて検出可能になる色素は、蛍光色素、発色色素及び化学発光色素のいずれであってもよい。発色色素としては、3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)、3-アミノ-9-エチルカルバゾール(AEC)、メチルグリーン、N-エチル-m-トルイジン誘導体(例えばN-ヒドロキシスルホプロピル誘導体(TOOS))と4-アミノアンチピリン(4-AA)の組み合わせなどが挙げられる。蛍光色素としては、10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジン(Amplex Red)、p-ヒドロキシフェニル酢酸、チアミンなどが挙げられる。化学発光色素としては、ルミノールなどが挙げられる。

[0048] ペルオキシダーゼに触媒されて検出可能になる色素は、その種類にもよるが、通常、0.1～1mMになるように試料中に添加されるのが好ましい。

[0049] 過酸化水素捕捉剤は、過酸化水素と反応して過酸化水素を水に分解可能な物質であれば特に限定されず、アスコルビン酸、グルタチオン、ヒスチジン、尿酸、遷移金属イオン(Fe^{2+} , Ti^{3+} , Co^{2+} など)、次亜塩素酸ソーダ($NaOCl$)などが挙げられる。

過酸化水素捕捉剤は、その種類にもよるが0.1～100mM、より好ましくは1～10mMになるように試料中に添加されるのが好ましい。

[0050] 本発明のキャピラリーイムノアッセイ法の原理を、説明する。イムノアッセイ用キャピラリーに試料が導入されると、目的タンパク質が存在する場合、目的タンパク質を介して第1抗体と2次抗体とがキャピラリーの内壁面付

近で複合体を形成する。この際、試料中に添加されたオキシダーゼの基質が、第1抗体が結合しているオキシダーゼにより酸化されて過酸化水素が発生する。この過酸化水素は、目的タンパク質を介して第1抗体に結合している第2抗体に結合しているペルオキシダーゼとともに、試料中に添加された上記の色素を検出可能な形に変換する。よって、抗原の存在が1ステップで検出可能になる。

[0051] 一方、目的タンパク質が存在しない場合、第1抗体と第2抗体は結合できないので、これらはキャピラリーの内腔で離れて存在する。ここで、内壁面に存在するオキシダーゼは、試料中に添加された基質から過酸化水素を発生させるが、この過酸化水素は、遠く離れて存在する第2抗体に結合しているペルオキシダーゼに利用されることなく、試料中に添加された過酸化水素捕捉剤に捕捉され、水に分解される。よって、試料中に添加された色素は、検出可能な形に変換されない。

[0052] 上記の色素は、検出可能な形に変換されると、キャピラリーの外側から、用いられる色素の種類に応じた検出装置を用いて検出できる。検出装置は、上記の色素が蛍光色素である場合、適切な励起光源を有する蛍光顕微鏡、蛍光光度計、CCDカメラ、フォトダイオード、光電子増倍管であり得る。検出装置は、上記の色素が発色色素である場合、分光光度計、CCDカメラ、フォトダイオード、光電子増倍管であり得る。検出装置は、上記の色素が化学発光色素である場合、CCDカメラ、フォトダイオード、光電子増倍管であり得る。

これらの検出装置は、色素からの検出されたシグナルを数値化できるソフトウェアを有する解析装置に接続されていることが好ましい。

[0053] 本発明のキャピラリーイムノアッセイ法は、抗原-抗体反応と、酵素反応との2種類の反応に基づく。抗原-抗体反応は、分子量が非常に大きいタンパク質同士の反応であるので、通常は非常に遅い反応である（通常、数時間）。しかし、本発明のキャピラリーイムノアッセイ法は、容量が非常に少ない（通常、数十～数百n l）キャピラリー内で行われる反応であるので、分

子が拡散する距離が短く、抗原-抗体反応は、比較的迅速に進行する（約10～20分程度）。

一方、酵素反応は、通常、非常に迅速に進行する反応である（通常、数十秒～数分）。しかし、本発明のキャピラリーイムノアッセイ法においては、試料に過酸化水素捕捉剤が適切な量で添加されているので、酵素反応が比較的ゆっくりと進行する（約10～20分程度）。

よって、これらの2種類の反応の反応速度の均衡を好ましい範囲に保つことが可能になり、本発明のイムノアッセイ法は、毛細管力で試料溶液を吸い上げるだけの1工程で、従来のイムノアッセイよりも短い反応時間で、少量の試料を用いて、1 ng/ml程度までの低い濃度の目的タンパク質の検出を可能にできる。

[0054] <イムノアッセイ用キャピラリーを含む微小流路デバイス>

本発明は、内部に分枝状又は格子状に貫通状流路が形成され、上記のイムノアッセイ用キャピラリーが該流路の少なくとも一部に埋設されてなる微小流路デバイスも提供する。

微小流路デバイスの流路の形状、材料、製造方法などについては、特開2005-140681号公報に記載されることと同様である。

[0055] 本発明の微小流路デバイスの好ましい形態の例を、図3に示す。図3は、幅300 μmの流路が形成された微量流路デバイス1を示す。この微小流路デバイスの一部に、AFPと結合可能な第1抗体及び第2抗体を有するイムノアッセイ用キャピラリー2、CEAと結合可能な第1抗体及び第2抗体を有するイムノアッセイ用キャピラリー3、hCGと結合可能な第1抗体及び第2抗体を有するイムノアッセイ用キャピラリー4がそれぞれ埋設されてなる。微小流路デバイスの試料滴下口5に試料を滴下し、試料吸引口6から試料を吸引することにより、各イムノアッセイ用キャピラリーに試料を毛細管力で導入することができる。そして、各イムノアッセイ用キャピラリーのある地点（例えば点線部）での蛍光強度を測定することにより、AFP、CEA及びhCGの検出を1ステップで行うことができる。

実施例

[0056] 製造例 1 イムノアッセイ用キャピラリーの作製

A. 角型キャピラリーの表面修飾

1. 内腔の一辺が100 μ mで、外形の一辺が300 μ mの角型キャピラリー (Polymicro technologies社製、WWP100375) に1 N NaOHを導入し、30分間静置した。
2. 十分な量の純水を通して洗浄後、アセトンを導入して水分を除去した。
3. キャピラリーを70°Cのオーブンに入れて、30分乾燥させた。
4. 30%(v/v)の3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)のアセトン溶液をキャピラリーに導入して、室温にて40分静置した。
5. アセトンで洗浄後、70°Cのオーブンに入れて、60分乾燥させた。
6. 2.5% (v/v)グルタルアルデヒド水溶液を導入して、室温にて40分間反応させた。
7. 純水でキャピラリー内を洗浄した。
8. 5%ポリエチレンイミン(v/v)水溶液 (リン酸緩衝液 pH9) を導入し、室温にて40分間反応させ、アミノ基を多数有するポリエチレンイミンを、キャピラリーの内壁面に固定した。
9. リン酸緩衝液pH9でキャピラリー内を洗浄した。
10. 2.5% (v/v)グルタルアルデヒド水溶液をキャピラリーに導入し、40分間反応させた。
11. リン酸緩衝液pH9でキャピラリー内を洗浄した。

[0057] B. キャピラリー内壁面への第1抗体と結合したオキシダーゼからなる不溶性層の形成

1. グルコースオキシダーゼ(5 mg/mL ; Sigma G7141)水溶液 (リン酸緩衝液pH9) を、上記のA. のようにして作製した、内壁面がグルタルアルデヒドで修飾されたキャピラリーに導入し、室温にて40分間反応させた。
2. リン酸緩衝液pH9でキャピラリー内を洗浄した。
3. 2.5% (v/v)グルタルアルデヒド水溶液を導入し、室温にて40分間反応さ

せた。

4. リン酸緩衝液pH9でキャピラリー内を洗浄した。
5. プロテインA (0.5 mg/mL ; Sigma P6031)水溶液 (リン酸緩衝液 pH9) を、キャピラリー内に導入し、室温にて40分間反応させて、アルデヒド基で修飾されたグルコースオキシダーゼにプロテインAを結合させた。
6. キャピラリー内を純水で洗浄した。
7. 0.1 M NaBH₄水溶液をキャピラリー内に導入し、室温にて40分間反応させた。
8. キャピラリー内を純水で洗浄後、Tris-HCl緩衝液pH7.4で洗浄した。
9. 第1抗体として、Tris-HCl緩衝液pH7.4で100倍に希釈した抗ヒトIgG (フナコシ, E80-104 Human ELISA quantitation kit) をキャピラリー内に導入し、室温にて40分間反応させて、プロテインAに第1抗体を結合させた。
10. トリス緩衝液pH7.4でキャピラリー内を洗浄した。
11. 1%ウシ血清アルブミン (BSA) のトリス緩衝液pH7.4溶液をキャピラリー内に導入し、室温にて2時間以上静置することにより、キャピラリーの内壁面の非特異吸着抑制コーティングを行った。
12. トリス緩衝液pH7.4でキャピラリー内を洗浄した。

[0058] C. ペルオキシダーゼと結合した第2抗体を含む親水性高分子の層の形成

1. 第2抗体として、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ヒトIgG (フナコシ, E80-104 Human ELISA quantitation kit) を、300mg/mL になるようにポリエチレングリコール (PEG ; 分子量20000) を溶解させたTris-HCl緩衝液pH7.4で100倍に希釈した。この溶液を、キャピラリーに20 μ L/分の速度で導入した直後に、30 μ L/分の速度で吸引し、第1抗体と結合したグルコースオキシダーゼからなる不溶性層の上に、ペルオキシダーゼと結合した第2抗体を含むポリエチレングリコールの層を積層した。
2. このイムノアッセイ用キャピラリーは、すぐに使用しない場合は-10°Cで保存できる。

[0059] 実施例 1

Tris-HCl緩衝液pH9に、以下の成分を溶解して、試料溶液を調製した。

ペルオキシダーゼにより触媒されて検出可能になる色素：

0.8 mM Amplex Red (Invitrogen社 A36006)；

オキシダーゼの基質：28 mMグルコース；

過酸化水素捕捉剤：10 mMアスコルビン酸；

目的タンパク質：ヒトIgG (0、0.1、1、10、1000及び5000 ng/mL；フナコシ、E80-104 Human ELISA quantitation kit)。

[0060] この試料溶液を、5mmに切断した上記の製造例1のようにして作製したイムノアッセイ用キャピラリーに接触させると、毛細管力で試料溶液(0.05 μ l)がキャピラリー内に導入された。試料溶液がキャピラリー内に導入された状態で、室温にて30分間静置した。

[0061] 蛍光顕微鏡(キーエンスVB7000)の対物レンズの下に、目的タンパク質を導入して反応させたイムノアッセイ用キャピラリーを置き、水銀ランプの光源(励起フィルター波長 540/25 nm、吸収フィルター波長 572 nm)にて、蛍光画像を取得した。

その後、そのデジタル画像を、Image-J(米国国立衛生研究所(NIH)が頒布するフリーソフトウェア：参照URL <http://rsbweb.nih.gov/ij/>)などのソフトウェアで解析し、蛍光信号を定量化した。

[0062] 得られた蛍光画像を図1(A)に示す。また、キャピラリーの試料溶液導入口から約2.5mmの点(図1(A)の点線部分)で測定した蛍光信号を、図1(B)に示す。

さらに、抗原濃度ゼロの信号をバックグラウンド信号とした、各抗原濃度における蛍光強度(ΔF)を、目的タンパク質の濃度の対数に対してプロットしたグラフを、図2に示す。

これらの結果から、本発明のイムノアッセイ用キャピラリーを用いて測定することにより、目的タンパク質の濃度にほぼ比例して、蛍光強度が増加する結果が得られたことがわかる。

[0063] よって、本発明のイムノアッセイ用キャピラリーを用いて、洗浄工程を必要とすることなく、1工程で簡便に、比較的短時間で、かつ少量の試料溶液を用いてイムノアッセイにより目的タンパク質を検出及び定量できることが確認できた。

[0064] 製造例2 HIV抗原測定用イムノアッセイ用キャピラリーの作製

A. 角型キャピラリーの表面修飾

製造例1のAと同様の手順で角型キャピラリーの内表面を修飾した。

[0065] B. キャピラリー内壁面への第1抗体と結合したオキシダーゼからなる不溶性層の形成

1. グルコースオキシダーゼ(5 mg/mL ; Sigma G7141)水溶液(リン酸緩衝液pH9)を、上記のA. のようにして作製した、内壁面がグルタルアルデヒドで修飾されたキャピラリーに導入し、室温にて40分間反応させた。

2. リン酸緩衝液pH9でキャピラリー内を洗浄した。

3. 2.5% (v/v)グルタルアルデヒド水溶液を導入し、室温にて40分間反応させた。

4. リン酸緩衝液pH9でキャピラリー内を洗浄した。

5. 抗HIV-1(p24)抗体(0.5 mg/mL ; Anogen MO-140002D2)水溶液(リン酸緩衝液pH9)を、キャピラリー内に導入し、室温にて40分間反応させて、アルデヒド基で修飾されたグルコースオキシダーゼに抗HIV-1(p24)抗体を結合させた。

6. キャピラリー内を純水で洗浄した。

7. 0.1 M NaBH₄水溶液をキャピラリー内に導入し、室温にて40分間反応させた。

8. トリス緩衝液pH7.4でキャピラリー内を洗浄した。

9. 1%ウシ血清アルブミン(BSA)のトリス緩衝液pH7.4溶液をキャピラリー内に導入し、室温にて2時間以上静置することにより、キャピラリーの内壁面の非特異吸着抑制コーティングを行った。

12. トリス緩衝液pH7.4でキャピラリー内を洗浄した。

- [0066] C. ペルオキシダーゼと結合した第2抗体を含む親水性高分子の層の形成
1. 第2抗体として、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗HIV-1 (p24)抗体 (Anogen M0-140002T2HRP) を、300mg/mL になるようにポリエチレングリコール (PEG ; 分子量20000) を溶解させたTris-HCl緩衝液pH7.4で100倍に希釈した。この溶液を、キャピラリーに20 μ L/分の速度で導入した直後に、30 μ L/分の速度で吸引し、第1抗体と結合したグルコースオキシダーゼからなる不溶性層の上に、ペルオキシダーゼと結合した第2抗体を含むポリエチレングリコールの層を積層した。
 2. このイムノアッセイ用キャピラリーは、すぐに使用しない場合は-10°Cで保存できる。

[0067] 実施例 2

Tris-HCl緩衝液pH9に、以下の成分を溶解して、試料溶液を調製した。

ペルオキシダーゼにより触媒されて検出可能になる色素 :

0.8 mM Amplex Red (Invitrogen社 A36006) ;

オキシダーゼの基質 : 28 mMグルコース ;

過酸化水素捕捉剤 : 10 mMアスコルビン酸 ;

目的タンパク質 : HIV-1 p24 Antigen (0, 0.1, 1, 10, 100及び1000 ng/mL ; Biodesign International, R18301)。

- [0068] この試料溶液を、5mmに切断した上記の製造例2のようにして作製したイムノアッセイ用キャピラリーに接触させると、毛細管力で試料溶液 (0.05 μ l) がキャピラリー内に導入された。試料溶液がキャピラリー内に導入された状態で、室温にて30分間静置した。

- [0069] 蛍光顕微鏡 (キーエンスVB7000) の対物レンズの下に、目的タンパク質を導入して反応させたイムノアッセイ用キャピラリーを置き、水銀ランプの光源 (励起フィルター波長 540/25 nm、吸収フィルター波長 572 nm) にて、蛍光画像を取得した。

その後、そのデジタル画像を、Image-J(米国国立衛生研究所 (NIH) が頒布するフリーソフトウェア : 参照URL <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) などのソフ

トウェアで解析し、蛍光信号を定量化した。

[0070] 抗原濃度ゼロの信号をバックグラウンド信号とした、各抗原濃度における蛍光強度 (ΔF) を、目的タンパク質の濃度の対数に対してプロットしたグラフを、図 4 に示す。ここでは、非特異的な応答を調べるために、目的タンパク質としての HIV-1 抗原 (◆) の代わりにヒト IgG (■) 及びウサギ IgG (▲) をキャピラリーに導入して測定した結果についても合わせて示す。

これらの結果から、本発明のイムノアッセイ用キャピラリーを用いて測定することにより、HIV 抗原の濃度に応じて、蛍光強度が増加する結果が得られたことがわかる。また、本発明のキャピラリーは、キャピラリー内に導入されている抗体に対する抗原を特異的に測定でき、該抗体と特異的には反応しない抗原に対しては、用量応答反応性がないこともわかる。

[0071] よって、本発明のイムノアッセイ用キャピラリーを用いて、洗浄工程を必要とすることなく、1 工程で簡便に、比較的短時間で、かつ少量の試料溶液を用いてイムノアッセイにより HIV 抗原を検出及び定量できることが確認できた。

[0072] 本発明は、2008 年 12 月 19 日に出願された日本国特許出願特願 2008-324059 号に関し、この特許請求の範囲、明細書、図面及び要約書の全ては本明細書中に参照として組み込まれる。

符号の説明

- [0073] 1 微量流路デバイス
2、3、4 本発明のイムノアッセイ用キャピラリー
5 試料滴下口
6 試料吸引口

請求の範囲

- [請求項1] キャピラリーの内壁面に、第1抗体と結合したオキシダーゼからなる不溶性層が形成され、
さらにその上に、ペルオキシダーゼと結合した第2抗体を含む親水性高分子の層が積層されてなり、
前記第1抗体と前記第2抗体とが、同じ抗原に対して結合可能であるイムノアッセイ用キャピラリー。
- [請求項2] 前記親水性高分子が、分子量2000～10万のポリエチレングリコールである請求項1に記載のイムノアッセイ用キャピラリー。
- [請求項3] 前記オキシダーゼがグルコースオキシダーゼであり、前記ペルオキシダーゼがセイヨウワサビペルオキシダーゼである請求項1に記載のイムノアッセイ用キャピラリー。
- [請求項4] キャピラリーの長手方向に垂直な横断面が、正方形及び矩形を含む方形であり、その内腔の一辺が50 μ m～1mmの長さである請求項1に記載のイムノアッセイ用キャピラリー。
- [請求項5] キャピラリーの内壁面を活性化処理し、
活性化処理された内壁面へオキシダーゼを結合させ、
前記オキシダーゼに第1抗体を結合させて不溶性層を形成し、
さらにその上に、ペルオキシダーゼと結合した第2抗体を含む親水性高分子の層を積層する
工程を含む、請求項1に記載のイムノアッセイ用キャピラリーの製造方法。
- [請求項6] キャピラリーの内壁面の活性化処理が、アミノ基、メタクリル基、カルボキシル基、イソシアネート基、エポキシ基、アルデヒド基、SH基から選択される少なくとも1つの官能基を有する化合物による活性化である請求項5に記載の方法。
- [請求項7] 請求項1に記載のイムノアッセイ用キャピラリーに、前記オキシダーゼの基質と、前記ペルオキシダーゼに触媒されて検出可能になる色

素と、過酸化水素捕捉剤とが添加された試料を導入する工程を含む、試料中での存在が疑われる目的タンパク質を検出するためのキャピラリーイムノアッセイ法。

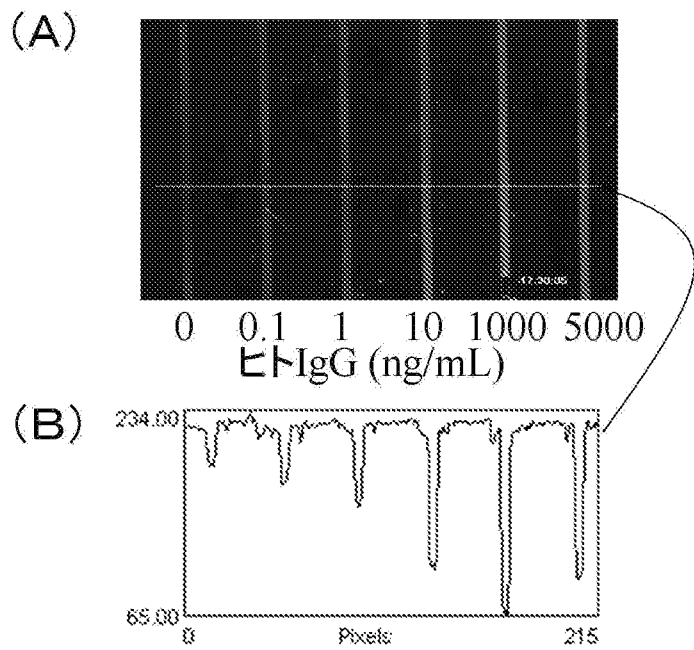
[請求項8] 前記過酸化水素捕捉剤が、アスコルビン酸、グルタチオン、ヒスチジン、尿酸、遷移金属イオン、次亜塩素酸ソーダ (NaOCl) から選択される請求項7に記載のキャピラリーイムノアッセイ法。

[請求項9] 前記目的タンパク質が、癌マーカー、糖尿病マーカー、肥満マーカー、炎症マーカー、動脈硬化性疾患マーカー、腎機能マーカー、HIVマーカー及び肝炎マーカーから選択される疾患マーカーである請求項7に記載のキャピラリーイムノアッセイ法。

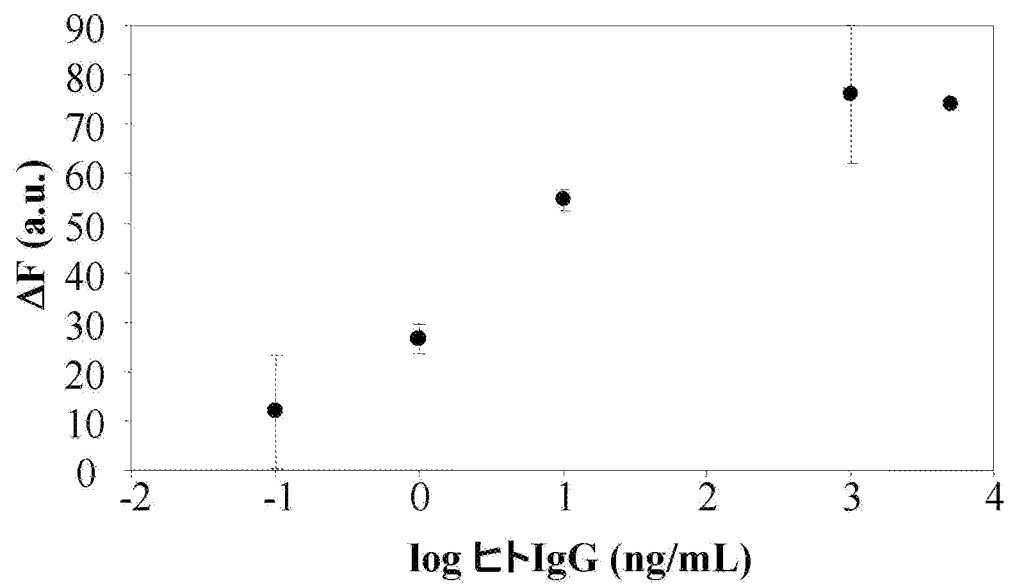
[請求項10] 前記基質、色素及び過酸化水素捕捉剤が、それぞれ、10~50mM、0.1~1mM及び0.1~100mMの濃度になるように試料に添加される請求項7に記載のキャピラリーイムノアッセイ法。

[請求項11] 内部に分枝状又は格子状に流路が形成され、請求項1に記載のイムノアッセイ用キャピラリーが前記流路の少なくとも一部に埋設される微小流路デバイス。

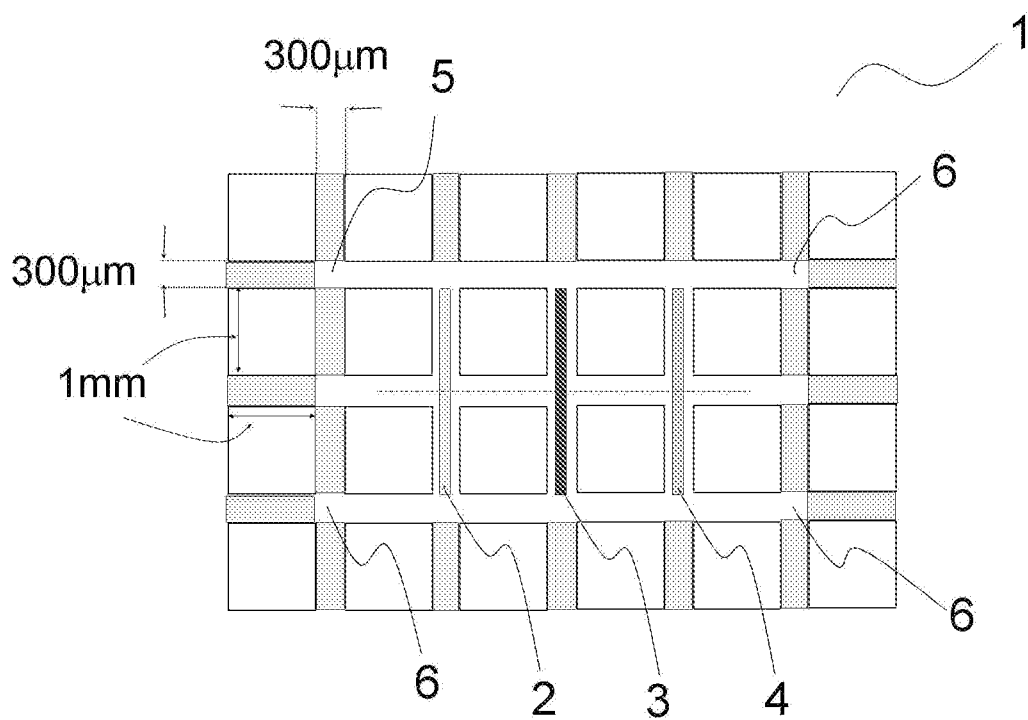
[図1]



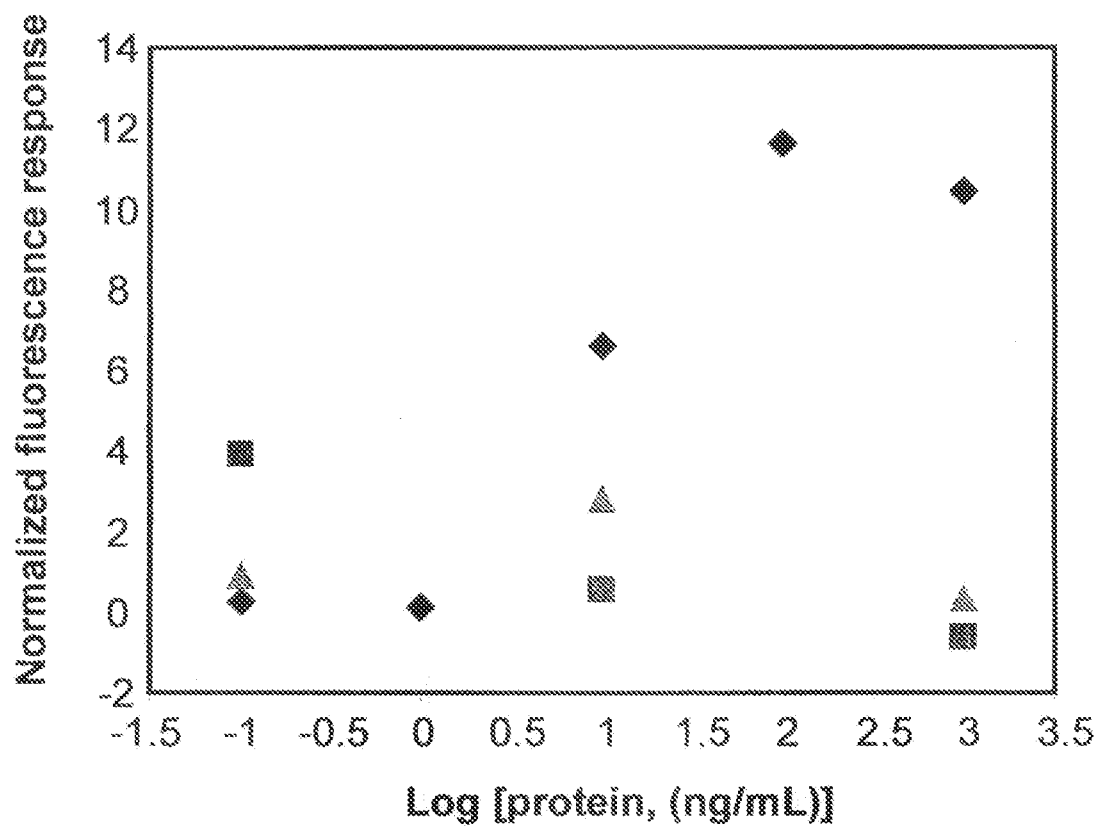
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2009/070485
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/543(2006.01) i, G01N33/53(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)
G01N33/543, G01N33/53, G01N37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

<i>Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1922-1996</i>	<i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i>	<i>1996-2010</i>
<i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1971-2010</i>	<i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1994-2010</i>

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	<i>JP 3116709 U (Yugen Kaisha Metabosukurin), 15 December 2005 (15.12.2005), entire text; all drawings (Family: none)</i>	1-11
A	<i>JP 1-150856 A (Bioventures, Inc.), 13 June 1989 (13.06.1989), claims; page 6, upper right column, lines 1 to 7 & US 4943525 A & EP 315364 A2 & AU 2460988 A & CA 1321541 A & AU 2460988 A1</i>	1-11

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

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search <i>12 January, 2010 (12.01.10)</i>	Date of mailing of the international search report <i>26 January, 2010 (26.01.10)</i>
---	--

Name and mailing address of the ISA/ <i>Japanese Patent Office</i>	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/070485

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Terence G. HENARES ET AL., "Drop-and-Sip" Fluid Handling Technique for the Reagent-ReleaseCapillary (RRC)-based Capillary-Assembled Microchip(CAs-CHIP): Sample Delivery Optimization andReagent Release Behavior in RRC, ANALYTICAL SCIENCES, 2008.01.10, VOL. 24, 127-132	1-11
A	Terence G. Henares et al., Multiple enzyme linked immunosorbent assay system on acapillary-assembled microchip integrating valvingand immuno-reaction functions, Analytica. Chimica. Acta., 2007.03.03, 589, 173-179	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, G01N33/53(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 (IPC))
 Int.Cl. G01N33/543, G01N33/53, 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 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2010年
 日本国実用新案登録公報 1996-2010年
 日本国登録実用新案公報 1994-2010年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

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 請求項の番号
A	JP 3116709 U (有限会社メタボスクリーン) 2005. 12. 15, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-11
A	JP 1-150856 A (バイオベンチャーズ, インコーポレイテッド) 1989. 06. 13, 特許請求の範囲、第6頁右上欄第1-7行 & US 4943525 A & EP 315364 A2 & AU 2460988 A & CA 1321541 A & AU 2460988 A1	1-11

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。

<p>* 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</p>	<p>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</p>
---	---

国際調査を完了した日 12. 01. 2010	国際調査報告の発送日 26. 01. 2010
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/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) 赤坂 祐樹 電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 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 請求項の番号
A	Terence G. HENARES ET AL., "Drop-and-Sip" Fluid Handling Technique for the Reagent-ReleaseCapillary (RRC)-based Capillary-Assembled Microchip(CAs-CHIP): Sample Delivery Optimization andReagent Release Behavior in RRC, ANALYTICAL SCIENCES, 2008.01.10, VOL. 24, 127-132	1-11
A	Terence G. Henares et al., Multiple enzyme linked immunosorbent assay system on acapillary-assembled microchip integrating valvingand immuno-reaction functions, Analytica. Chimica. Acta., 2007.03.03, 589, 173-179	1-11