

(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2004-83501

(P2004-83501A)

(43) 公開日 平成16年3月18日(2004.3.18)

(51) Int. Cl.⁷

C07K 16/00

G01N 33/531

F I

C07K 16/00

G01N 33/531

テーマコード (参考)

4H045

A

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2002-248087 (P2002-248087)	(71) 出願人	000003609 株式会社豊田中央研究所 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道4 1 番地の1
(22) 出願日	平成14年8月28日 (2002. 8. 28)	(74) 代理人	100097733 弁理士 北川 治
		(72) 発明者	浅見 修 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道4 1 番地の1 株式会社豊田中央研究所内
		(72) 発明者	高橋 治雄 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道4 1 番地の1 株式会社豊田中央研究所内
		(72) 発明者	山田 幸生 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道4 1 番地の1 株式会社豊田中央研究所内
		Fターム(参考)	4H045 AA11 AA30 DA75 EA50

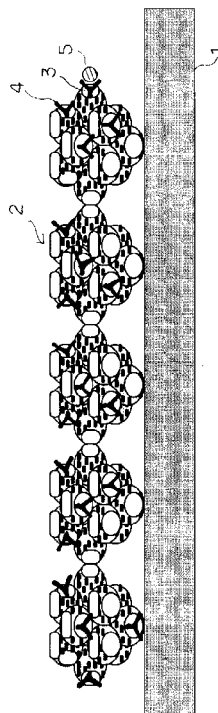
(54) 【発明の名称】 安定化抗体とこれを利用する免疫反応法及び免疫反応装置

(57) 【要約】

【課題】 抗体安定化効果の高い抗体固定化技術と、これを利用した免疫反応法及び免疫反応装置を提供する。

【解決手段】 構造安定性を有する構造ユニットにおける、抗体等の直径とほぼ同等乃至やや大きい孔径の細孔中に、抗体又は抗体フラグメントを固定化する。構造ユニットは、好ましくは多数の均一な孔径のメソポアを有するメソポーラスシリカ多孔体である。このように固定化した安定化抗体の、抗原との特異的結合反応を利用した、免疫反応法及び免疫反応装置。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

構造安定性を有する構造ユニットにおける、抗体又は抗体フラグメントの直径に対してほぼ同等乃至やや大きい孔径の細孔中に、前記抗体又は抗体フラグメントを固定化したことを特徴とする安定化抗体。

【請求項 2】

前記構造ユニットが、粉状の形態、粒状の基体材料の表面に膜状に形成された形態、又は任意形状の抗体固定床の表面に膜状に形成された形態のいずれかであることを特徴とする請求項 1 に記載の安定化抗体。

【請求項 3】

前記構造ユニットが、界面活性剤のミセルのまわりに一定のシリカ質材料を用いて無機の骨格を形成した後、界面活性剤のミセルを除去して多数の均一な孔径を有するメソポアを形成したメソポーラスシリカ多孔体であることを特徴とする請求項 1 又は請求項 2 に記載の安定化抗体。

【請求項 4】

抗原 - 抗体間の特異的結合反応を利用して目的物質の検出、測定又は精製を行う免疫反応法であって、その抗体として請求項 1 ~ 請求項 3 のいずれかに記載の安定化抗体を用いることを特徴とする免疫反応法。

【請求項 5】

抗原 - 抗体間の特異的結合反応を利用して目的物質の検出、測定又は精製を行うための免疫反応装置であって、該免疫反応装置における抗体を用いる部材、部位又はプロセスにおいて請求項 1 ~ 請求項 3 のいずれかに記載の安定化抗体を用いることを特徴とする免疫反応装置。

【請求項 6】

前記免疫反応装置が、イムノアッセイ装置、イムノクロマトグラフィ装置、イムノバイオセンサー、水晶振動子センサー又は表面プラズモン共鳴センサーであることを特徴とする請求項 5 に記載の免疫反応装置。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、構造安定性を有する構造ユニットにおける特定の孔径の細孔中に抗体又は抗体フラグメントを固定化した安定化抗体と、この安定化抗体を利用した免疫反応法及び免疫反応装置に関する。

【0002】**【従来の技術】**

抗体（免疫グロブリン）は、抗原に対して特異的かつ鋭敏に免疫反応を起こすことから、単に医療目的での人体等への投与だけでなく、近年はむしろ、抗原あるいは抗原と結合した一定の目的物質に対するセンシング手段、測定手段、精製手段等としての利用が注目されている。そして、機能性タンパク質である抗体は温度、pH 又は酵素作用等の環境要因により失活（即ち抗原との結合能を喪失）し易いため、その保存時や使用時において安定化を図ることが望ましい。

【0003】

抗体が医薬として人体等に投与される場合には、生物体に対する安全の考慮から、抗体の安定化手段の種類はかなり限定される。しかし、上記のようなセンシング手段等として抗体を利用する場合には、医療になじまないような任意の手段で抗体を安定化したり、利用目的に合致した任意の形態で抗体を固定化することができる。以上の事情を踏まえ、従来より、抗体の安定化技術や固定化技術が種々に提案されている。

【0004】

抗体の安定化技術としては、特公昭 62 - 20965 号公報に開示された方法が例示される。この方法は、免疫グロブリンを注射用に製剤化する際、生体内での抗体活性の持続時

10

20

30

40

50

間を長くする目的でこれをスルホン化し、更に製造工程における凝集白濁化（抗体の失活）を抑制するために血清アルブミン、グリシン、マンニトール等を添加するものである。

【0005】

次に、特開昭63-88197号公報に開示された方法では、溶液状態のモノクローナル抗体に対してグリセロール等の多価アルコールを添加することにより、保存期間中の抗体活性の低下を防ごうとする。又、特開昭63-225320号公報に開示された方法では、抗体溶液にデキストランを添加して、抗体のオリゴマー化、分解又は析出による活性低下の防止を図っている。更に、特許第2966592号公報に開示された方法ではヒトモノクローナル抗体製剤の凍結乾燥後の再溶解時における安定化のためマンニトールを添加し、特公平6-99325号公報に開示された方法では卵アルブミン加水分解物の添加により抗体の溶液状態の安定化を図っている。

10

【0006】

一方、抗体の固定化技術、即ち、抗体を一定の形態を持った材料又は部材に固定化する事は、免疫測定法や免疫センサー等においては日常的に行われている。抗体の固定化担体としては、ラテックスやポリスチレンチューブ等が一般的であるが、その他にも、例えば特公平7-122622号公報に開示されたフィブロインフィルム、特許第2642342号公報に開示された不溶性多孔質シート、USP4071409号公報に開示された多孔質ガラス等が例示される。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

上記した従来 of 抗体の安定化技術は、いずれも抗体の溶液状態での安定化又は析出防止を目的とし、抗体溶液中に安定化剤を共存させる点において共通する。しかし、単に安定化剤を共存させる方式では、仮に抗体溶液を低温下や凍結乾燥状態で保存しても、その安定化効果は限定されたものである。通常、このような方式による有効な保存期間は数ヶ月程度以下であり、実用的要求に必ずしも応えていなかった。しかも、種々の理由により抗体溶液のpHが大きく変化したり、抗体溶液に有機溶媒を混入させたりした場合には、ほとんど安定化効果を期待できない。

20

【0008】

一方、上記した従来 of 抗体の固定化技術については、当該技術分野の常識からして、十分な固定化効果を得ることがまず優先され、安定化効果については必ずしも十分に考慮されていない。実際、上記従来 of 抗体固定化技術においては、固定化が抗体活性に与える影響について言及も評価もしていない。

30

【0009】

以上のように、抗体活性を安定化するために抗体を固定化する、と言う技術目的を明示した従来技術は存在しない。更には、抗体安定化のために必要又は有益な固定化の形態を具体的に提示した従来技術は存在しない。本願発明は、従来 of 抗体固定化技術とは異なるアプローチで、抗体の固定化を抗体の安定化技術として捉え直し、抗体安定化効果の高い抗体固定化技術を開発すること、及び、その技術的メリットを享受できる免疫反応法及び免疫反応装置を提供することを、解決すべき課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

（第1発明の構成）

上記課題を解決するための本願第1発明（請求項1に記載の発明）の構成は、構造安定性を有する構造ユニットにおける、抗体又は抗体フラグメントの直径に対してほぼ同等乃至やや大きい孔径の細孔中に、前記抗体又は抗体フラグメントを固定化した、安定化抗体である。

【0011】

（第2発明の構成）

上記課題を解決するための本願第2発明（請求項2に記載の発明）の構成は、前記第1発明に係る構造ユニットが、粉状の形態、粒状の基体材料の表面に膜状に形成された形態、

40

50

又は任意形状の抗体固定床の表面に膜状に形成された形態のいずれかである、安定化抗体である。

【0012】

(第3発明の構成)

上記課題を解決するための本願第3発明(請求項3に記載の発明)の構成は、前記第1発明又は第2発明に係る構造ユニットが、界面活性剤のミセルのまわりに一定のシリカ質材料を用いて無機の骨格を形成した後、界面活性剤のミセルを除去して多数の均一な孔径を有するメソポアを形成したメソポーラスシリカ多孔体である、安定化抗体である。

【0013】

(第4発明の構成)

上記課題を解決するための本願第4発明(請求項4に記載の発明)の構成は、抗原-抗体間の特異的結合反応を利用して目的物質の検出、測定又は精製を行う免疫反応法であって、その抗体として第1発明~第3発明のいずれかに係る安定化抗体を用いる、免疫反応法である。

10

【0014】

(第5発明の構成)

上記課題を解決するための本願第5発明(請求項5に記載の発明)の構成は、抗原-抗体間の特異的結合反応を利用して目的物質の検出、測定又は精製を行うための免疫反応装置であって、該免疫反応装置における抗体を用いる部材、部位又はプロセスにおいて第1発明~第3発明のいずれかに係る安定化抗体を用いる、免疫反応装置である。

20

【0015】

(第6発明の構成)

上記課題を解決するための本願第6発明(請求項6に記載の発明)の構成は、前記第5発明に係る免疫反応装置が、イムノアッセイ装置、イムノクロマトグラフィー装置、イムノバイオセンサー、水晶振動子センサー又は表面プラズモン共鳴センサーである、免疫反応装置である。

【0016】

【発明の作用・効果】

(第1発明の作用・効果)

第1発明の安定化抗体では、構造安定性を有する構造ユニットにおいて、抗体又は抗体フラグメント(以下、単に「抗体等」と言うときは、抗体及び抗体フラグメントを意味する)の直径とほぼ同等か、これよりやや大きい孔径の細孔中に抗体等を固定化している。そのため、細孔中において抗体等の分子レベルでの大きな変形が物理的に規制され、抗体の活性な立体的コンフォメーションが安定的に維持される。即ち、前記従来技術に比較して、抗体等の失活が著しく起こり難い。

30

【0017】

構造ユニットに構造安定性がない場合は、十分な安定化効果を期待できない。、構造ユニットの細孔が抗体等に比較して過大であると、抗体等が固定化された細孔内に大きな隙間が残る恐れがあり、抗体の活性な立体的コンフォメーションが十分に保護されない。構造ユニットの細孔が抗体等に比較して過小であると、抗体等の分子全体が十分に細孔内に入り込めないで、やはり抗体活性が有効に保護されない。

40

【0018】

第1発明のように、抗体の立体的コンフォメーションを3次元の物理的な空間規制によって安定化させると言う試みは、溶液状態の抗体に安定化剤を添加する従来技術に比較して、新規かつ斬新である。又、専ら固定化を目的として抗体を担体に結合させる従来技術の場合、抗体を担体表面へ固定化する技術においては、抗体の立体的コンフォメーションがほとんど保護されないから、安定化効果が極めて乏しいと考えられる。抗体を多孔質材料に固定化する従来技術も存在するが、抗体の立体的コンフォメーションの3次元的空間規制に不可欠な細孔-抗体間のサイズの関係が考慮されていないため、その安定化効果は限定的であると考えられる。

50

【0019】

第1発明の安定化抗体における抗体の安定化効果は、安定化抗体が保存上の要求や使用上の要求から、乾燥状態や水溶液等の液体中での分散状態にあっても、十分に維持される。

【0020】

一方、従来の抗体安定化技術において、有機溶媒やpH変化に対する抗体の安定化は未解決の問題の一例である。例えば、水に難溶性の環境ホルモン、薬物等を対象とする測定に抗体を用いる場合、測定系に有機溶媒を使用又は添加したい場合がある。水晶振動子センサーや表面プラズモン共鳴センサー等においては、抗体が繰り返し使用され、一旦は結合した抗原と抗体を酸処理、アルカリ処理等により解離させる必要がある。第1発明の安定化抗体は、これらの場合においても安定であることが確認された。

10

【0021】

(第2発明の作用・効果)

上記第1発明に係る安定化抗体の担体たる構造ユニットは任意の材料形態を備えることができるが、抗体の保存目的又は使用目的に対応して、より好ましくは粉状の形態、粒状の基体材料の表面に膜状に形成された形態、又は任意形状の抗体固定床の表面に膜状に形成された形態のいずれかとすることができる。

【0022】

構造ユニットが粉状の形態をとる場合には、抗体の分散液状態での保存又は使用、凍結乾燥状態での保存等に有利である。構造ユニットが粒状の基体材料の表面に膜状に形成された形態をとる場合には、クロマトグラフィー用カラムへの充填、イムノクロマトグラフィーにおける固定化等に有利である。構造ユニットが任意形状の抗体固定床の表面に膜状に形成された形態をとる場合には、水晶振動子イムノセンサー、表面プラズモン共鳴センサー等に有利である。

20

【0023】

(第3発明の作用・効果)

上記第2発明に係る安定化抗体において、構造ユニットがメソポーラスシリカ多孔体である場合、製造プロセス上も有利であり、抗体の特に高い安定化効果が得られ、しかも抗体を高単位に固定化できる。

【0024】

その第1の理由は、後述のようにメソポーラスシリカ多孔体の製造プロセスを選択することにより、粉状の形態の構造ユニットや、任意形状の基体表面に膜状に形成された形態の構造ユニットとを自由に造り分けることができる点である。第2の理由は、界面活性剤の種類を選択により、ミセルのサイズの制御を通じて、構造ユニットにおける最適な細孔径を正確に決定できることである。第3の理由は、単一種類の界面活性剤を用いることにより、構造ユニットにおける多数の細孔を均一な孔径に揃えることができる点である。第4の理由は、上記のような細孔を高密度に備えた多孔体が得られるので、抗体の高単位固定化が容易となる点である。

30

【0025】

(第4発明の作用・効果)

第4発明の免疫反応法においては、第1発明～第3発明に係る安定化抗体を用いるので、その実施に当たり第1発明～第3発明の上記作用・効果を十分に享受することができる。

40

【0026】

(第5発明の作用・効果)

第5発明の免疫反応装置においては、抗体を用いる部材、部位又はプロセスにおいて第1発明～第3発明に係る安定化抗体を用いるので、その実施に当たり第1発明～第3発明の上記作用・効果を十分に享受することができる。

【0027】

(第6発明の作用・効果)

上記第5発明に係る免疫反応装置としては、イムノアッセイ装置、イムノクロマトグラフィー装置、イムノバイオセンサー、水晶振動子センサー又は表面プラズモン共鳴センサー

50

を好ましく例示することができる。

【0028】

【発明の実施の形態】

次に、第1発明～第6発明の実施の形態について説明する。以下において単に「本発明」と言うときは、第1発明～第6発明を一括して指している。

【0029】

〔抗体等〕

本発明において対象となる抗体又は抗体フラグメント（抗体等）の種類は限定されない。抗体フラグメントとは、完全な抗体に比較してアミノ酸配列又は立体構造において部分的に欠失しているが、抗原との特異的な結合能力を実質的に保持しているポリペプチドを言う。

10

【0030】

対象となる抗体としては、具体的には、抗体のFc部分を欠失させた $(Fab)_2$ もしくは Fab型抗体、あるいは遺伝子組換え技術によって作製した ScFV 型抗体等を例示することができる。

【0031】

〔安定化抗体〕

本発明に係る安定化抗体は、構造安定性を有する構造ユニットにおける、抗体等の直径に対してほぼ同等乃至やや大きい孔径の細孔中に、抗体等を固定化したものである。「ほぼ同等乃至やや大きい」とは、例えば、構造ユニットの細孔の径が抗体等の直径とほぼ同等以上であり、かつ、抗体等の直径の1.5倍以下、より好ましくは1.2倍以下であることを言う。

20

【0032】

構造ユニットの細孔と抗体等の直径が上記の関係にあるとき、抗体が十分に安定化され、かつ、固定化された抗体等が抗原と反応するために必要な僅かな立体的コンフォメーションの変化や、抗原との結合・解離が効率的に行われる。

【0033】

安定化抗体の構造の一例を図1に概念化して示す。図1は、基体材料の表面に膜状に形成された構造ユニットと、該構造ユニットに固定化された抗体との概念図である。基体材料である固定床1上には構造ユニット2が膜状に形成されている。構造ユニット2はpH、熱、流体の流動等の環境条件に対して構造安定性を有する中空の構造体である。構造ユニット2の細孔3には略「Y」字形に図示する抗体4が収容・固定化されている。この抗体4は、抗原5に対する特異的な結合能力を発現するものであり、通常の抗体や、抗体フラグメント即ち抗体活性部位を含有する抗体断片等により構成される。抗体4は、構造ユニット2の細孔3中に固定化されることにより、立体構造の大きな変化による失活が抑制されると共に、抗原5との特異的結合に必要な活性部位の比較的小さな構造変化は許容する程度の自由度を与えられる。

30

【0034】

抗体4は、構造ユニット2に対して van der Waals力等により結合している。構造ユニット2の細孔3の空間形状は、抗体4の立体形状とほぼ合致していることが、特に好ましい。この場合の蜂の巣形状の構造ユニット2は、例えば後述のように、層状シリケートと界面活性剤を利用して形成されるメソポーラスシリカ多孔体等であり得る。

40

【0035】

〔構造ユニット〕

上記図1に示す構造ユニット2は、無機材料から構成されても良く、有機ポリマー等の有機材料から構成されても良い。有機材料からなる構造ユニット2においては、抗体の周りを、場合によっては構造ユニットと抗体とを連結する要素であるアンカーユニットを介して、被覆するためのポリマー形成反応が必要である。上記ポリマーの種類や、これを構成すべきモノマーの種類は、発明の目的を阻害しない限りにおいて特段に限定されない。

【0036】

50

無機材料からなる構造ユニットとしては、例えばケイ酸 (SiO_2) やアルミナ等の各種金属酸化物、 $\text{SiO}_2 - \text{MO}_2 / n$ (MはAl等の金属) で表される複合酸化物等によって構成することができる。例えば、ケイ酸からなる構造ユニットの形成方法として、カネマイトのような層状シリケート、アルコキシシラン、シリカゲル、水ガラス、ケイ酸ソーダ等を好ましく用いることができる。

【0037】

無機材料から構造ユニットを作製するには、無機材料を界面活性剤(テンプレート物質)と混合反応させ、界面活性剤のミセルのまわりに無機の骨格が形成された界面活性剤/無機複合体を形成させた後、例えば $400^\circ\text{C} \sim 600^\circ\text{C}$ での焼成や、有機溶剤抽出等により界面活性剤を除去して、界面活性剤のミセルと同じサイズ及び形状のメソポア細孔を無機骨格中に形成することができる(メソポーラスシリカ多孔体)。従って、メソポーラスシリカ多孔体においては、抗体等とほぼ対応したサイズの多数の細孔を均一な孔径を以て形成できる点に大きな特徴がある。

10

【0038】

上記構造ユニットの作製方法において、ケイ素含有化合物例えばケイ酸を出発材料とする場合には、カネマイトの如き層状シリケートをまず形成し、この層間にミセルを挿入し、ミセルが存在しない層間をシリケート分子で繋ぎ、その後ミセルを除去して細孔を形成することができる。この方法は、粉状の形態を持つ構造ユニットを作製するのに適している。

【0039】

又、上記構造ユニットの作製方法において、ケイ素含有モノマー(例えば水ガラス、アルコキシシラン)を出発材料とし、界面活性剤のミセルの周囲にケイ素含有モノマーを集合させて重合させることによりシリカを形成し、次いでミセル分子を取り除いて細孔を形成することもできる。この方法は、ケイ素含有モノマーを含む反応液を、例えば粒状の基体材料や一定の形状又は形態を持った抗体固定床等のベース材の表面に塗布したり、スピコートしたりした後、ケイ素含有モノマーを重合させることにより、ベース材の表面膜の形態を持つ構造ユニットを作製するのに適している。

20

【0040】

カネマイトの如き層状シリケートの形成を介して構造ユニットを形成する方法においては、細孔表面は疎水性であり、かつアニオン性を有する。疎水性表面は水和していない抗体の安定な固定化のために好ましく、アニオン性表面は表面にカチオンを有する抗体の固定化のために好ましい。

30

【0041】

上記ミセルは、適当な媒体中に各種の界面活性剤、例えばアルキルトリメチルアンモニウムのような陽イオン界面活性剤や、例えばアルキルスルホン酸塩のような陰イオン界面活性剤や、例えばポリエチレングリコール系等の非イオン界面活性剤、を分散させることにより形成される。ミセル形状としては、球状、シリンダー状、層状等があり、又、それらが規則的に配列してヘキサゴナル、キュービック構造を持つ、液晶構造が形成される。

【0042】

界面活性剤のアルキル鎖の長さを変えることによりミセルの径を変化させ、形成される細孔の径を制御することができる。又、界面活性剤と併せ、トリメチルベンゼン、トリプロピルベンゼン等の比較的疎水性の分子を添加することにより、ミセルを膨潤させ、結果的に更に大きな細孔を形成することもできる。

40

【0043】

構造ユニットの形態としては粉末状、顆粒状、バルク状、膜状等がある。構造ユニットを構成する多孔性細孔の好ましい細孔径(直径)は、その中に固定される抗体の直径との対応で規定されるが、一般的には、1nmより大きく、好ましくは2nmより大きい。又、一般的に30nmより小さい。

【0044】

前記アンカーユニットを構成する分子としては構造ユニットと基本的には同じ構造が望ま

50

しく、特に酵素が活性ユニットである場合に、これに結合するために、水酸基，アミド基，アミノ基，ピリジン基，ウレア基，ウレタン基，カルボン酸基，フェノール基，アゾ基，ヒドロキシル基，シラン誘導体，アミノアルキレン基等の官能基が結合していることが必要である。

【0045】

本発明の安定化抗体を組み立てるに当たり、まず抗体に直接連結させる分子を介してポリマー反応を行い、抗体を収容した状態で構造ユニットを形成しても良く、又、構造ユニットを先に形成しておき、これに、場合によっては抗体自身が有するリジンのアミノ基等を介して抗体を導入しても良い。抗体と構造ユニットとの結合は、前記 van der Waals 力による結合や共有結合のみならず、イオン結合，水素結合，疎水結合等であ

10

【0046】

〔免疫反応法〕

本発明に係る免疫反応法は、上記安定化抗体を用いることにより、抗原 - 抗体間の特異的結合反応を利用して目的物質の検出、測定又は精製を行うものである限りにおいて、限定されない。

【0047】

本発明に係る免疫反応法として、より好ましくは、ラジオイムノアッセイ法、酵素免疫測定法、ラテックス凝集法、イムノクロマトグラフィー法等を例示できる。

【0048】

〔免疫反応装置〕

本発明に係る免疫反応装置は、抗原 - 抗体間の特異的結合反応を利用して目的物質の検出、測定又は精製を行うための免疫反応装置であって、該免疫反応装置における抗体を用いる部材、部位又はプロセスにおいて上記安定化抗体を用いる限りにおいて、その種類や構成を限定されない。

20

【0049】

本発明に係る免疫反応装置として、より好ましくは、イムノアッセイ装置、イムノクロマトグラフィー装置、イムノバイオセンサー、水晶振動子センサー又は表面プラズモン共鳴センサーを例示できる。

【0050】

図2に、本発明に係る免疫反応装置の一種であるイムノクロマトグラフィー装置の簡略化した構成例を示す。図2において、抗体を固定化した担体が充填されているアフィニティカラム6に対して、抗原を含む水溶液がポンプ7から送液される。そしてカラム中では抗原のみが吸着され、それ以外の物質は素通りする。その後、バルブ8の切り替えによりポンプ9から送液された酸性の溶出液によって、抗原がアフィニティカラム6から分離され、フラクションコレクター部10の試験管等に回収される。なお、この装置の場合、アフィニティカラム6のpHを元の状態に戻すことにより再使用でき、繰り返し使用の可能な回数が多いほど好ましいものである。

30

【0051】

図3に、本発明に係る免疫反応装置の一種である水晶振動子センサーの簡略化した構成例を示す。図3(a)において、公知の構成を持つ水晶振動子11が設置された容器12において、表面に抗体13を固定化したラテックス粒子14が水溶液中に懸濁されている。この容器12に抗原15を投入すると、図3(b)のように抗原 - 抗体反応を通じて水晶振動子11上での免疫ラテックス凝集反応が起こり、水晶振動子11の振動周波数が変化する。その変化量を読み取って抗原を定量するのである。この装置の場合、抗体を固定化したラテックス粒子は使い捨てとなるため、抗体の保存期間が長いことが好ましい。

40

【0052】

【実施例】

〔実施例1：メソポーラスシリカ多孔体の合成 - 1〕

TEOS (テトラエトキシシラン)、塩酸でpH2に調整した水、及びエタノールを、1

50

: 5 : 3 . 8 の重量割合に混合し、25度Cで攪拌した後、40 ~ 60 ° Cで適当な時間放置してゾル化させた。この放置時間は通常、0 . 5 ~ 23時間の範囲内である。次いで、エタノールで希釈したCATB (セチルトリメチルアンモニウムブロマイド) を、超音波攪拌下で添加した。CATBの添加量は、1モルのSiに対してCATBが0 . 1モルとなる割合とした。

【0053】

次に、上記の反応液を0 . 45 μmのフィルターで濾過した後、ベース材としての金膜上で2000 r . p . m . の条件でスピンコートし、薄膜を形成させた。この金膜は、予め界面活性剤中で超音波洗浄し、十分に水洗して窒素気流中で乾燥しておいたものである。上記の薄膜を形成させた金膜は、室温で1日乾燥させた後、400 ° Cにて12時間加熱することにより、CATB等の有機成分を完全に除去した。これにより、多孔体薄膜 (本例に係る、薄膜状に形成されたメソポーラスシリカ多孔体を伴う金膜を言う。以下同様) を得た。

10

【0054】

〔実施例2 : 安定化抗体の作製 - 1 〕

上記の多孔体薄膜を収容した容器に、マウスモノクローナル抗体 (抗原はコルチゾール) を脱イオン水にて10mg/mlに希釈した液100mlを注加して、4 ° Cで4時間以上緩やかに混和することにより、多孔体薄膜における薄膜状メソポーラスシリカ多孔体の細孔に抗体を固定化した。その後、安定化抗体薄膜 (本例に係る、抗体固定化薄膜状メソポーラスシリカ多孔体を伴う金膜を言う。以下同様。) を脱イオン水で3回洗浄した。

20

【0055】

〔実施例3 : 結合活性の測定 〕

上記の安定化抗体薄膜をシャーレの底に置き、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識したコルチゾールと室温で2時間反応させた。次に安定化抗体薄膜を十分に水洗した後、ペルオキシダーゼの基質であるo - フェニレンジアミン溶液を用いて発色反応を行った。そして基質溶液の490nmにおける吸光度を測定することにより、抗体のコルチゾールに対する結合活性 (以下、単に「結合活性」とも言う。) を求めた。

【0056】

なお、この場合のネガティブコントロールとしては、前記多孔体薄膜に対してコルチゾール抗体でない非特異的なマウスイムノグロブリンを実施例2と同様にして固定化したものを用い、両者の吸光度の差より結合活性を求めた。その結果を表1に示すが、コントロールと比較して本実施例は吸光度が明らかに高く、抗体が有効に固定化され、かつ固定化後も有効に抗原抗体反応が起きていることが分かった。

30

【0057】

【表1】

金薄膜の種類	490nm吸光度
抗コルチゾール抗体固定化金薄膜	0.380
非特異抗体固定化金薄膜	0.021

40

〔実施例4 : 乾燥状態での安定化効果 〕

実施例2で得た安定化抗体薄膜を乾燥状態で37 ° Cにて長期に (具体的には、表2に示す日数) 保存し、抗体の結合活性の経時変化を調べた。対照として、ベース材としての金膜上に、公知の手段により実施例2と同じコルチゾール抗体を同じ量的割合で非共有結合により固定化させたもの (以下、単に「抗体固定化金膜」と言う。) を用いた。

【0058】

これらの測定結果を、固定化直後の結合活性を100とした場合の相対活性値で表2に示すが、対照例と比較して、本実施例は乾燥状態での経時的安定性が格段に高かった。

【0059】

50

【表 2】

日数	多孔体固定化コルチゾール抗体	直接固定化コルチゾール抗体
0	100	100
5	95	10
20	92	0
40	88	0
60	80	0

10

〔実施例 5：溶液状態での安定化効果〕

実施例 4 で用いたものと同じ安定化抗体薄膜及び対照例の抗体固定化金膜について、この両者を 37 °C にて pH 7.4 のリン酸緩衝液中に長期に（具体的には、表 3 に示す日数）保存し、抗体の結合活性の経時変化を調べた。

【0060】

これらの測定結果を、固定化直後の結合活性を 100 とした場合の相対活性値で表 3 に示すが、対照例に比較して、本実施例は溶液中での経時的安定性が格段に高かった。

【0061】

【表 3】

日数	多孔体固定化コルチゾール抗体	直接固定化コルチゾール抗体
0	100	100
5	92	15
20	89	3
40	84	0
60	75	0

20

〔実施例 6：有機溶媒存在下での安定化効果〕

実施例 4 で用いたものと同じ安定化抗体薄膜及び対照例の抗体固定化金膜について、この両者を 20% エタノールを含むリン酸緩衝液中で、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識したコルチゾールと室温下 0.5 ~ 3 時間（具体的には、表 4 に示す時間数）反応させた。反応後、安定化抗体薄膜及び抗体固定化金膜を洗浄し、ペルオキシダーゼの基質である o-フェニレンジアミン溶液を用いて発色反応を行った。

30

【0062】

そして実施例 3 の場合と同様にして抗体の結合活性を測定した。その結果を表 4 に示すが、本実施例においては抗体反応時間を長くすることで結合活性が増大し、2 時間でほぼプラトーに達した。一方、対照例の抗体固定化金膜では、恐らくはエタノールによる抗体の変性のため、抗体反応時間を長くすることで結合活性が低下した。

【0063】

【表 4】

反応時間	多孔体固定化コルチゾール抗体	直接固定化コルチゾール抗体
0.5	0.28	0.08
1	0.36	0.05
2	0.39	0.02
3	0.4	0

40

〔実施例 7：繰り返し使用における安定化効果〕

ヒトアルブミンに対する抗体を、実施例 2 と同じ要領で多孔体薄膜に固定化した。一方、

50

対照として、実施例 4 に係る抗体固定化金膜と同じ要領でヒトアルブミンに対する抗体を金膜上に固定化した。これらの膜体について、SPR（表面プラズモン共鳴）センサーを用いて繰り返し使用における抗体の安定化効果を調べた。

【0064】

即ち、これらの膜体を SPR センサーの抗体固定化チップ部として組み込み、ヒトアルブミン溶液を送液して、RU（レゾナンスユニット）で抗体との結合活性を求めた。その後、0.1 M の塩酸溶液を流してアルブミンと抗体との結合を解離させ、更にアルブミン溶液を送液して抗体との結合活性を求めた。このような操作の繰り返しを合計 5 回行い、その都度の抗体との結合活性を測定した。

【0065】

その結果を表 5 に示すが、本実施例に係る安定化抗体薄膜では、塩酸による抗原と抗体との解離を伴う操作の繰り返しによっても、結合活性（RU）はほとんど低下しなかった。対照例では、上記操作の繰り返しに伴い結合活性の大きな低下が認められた。

【0066】

【表 5】

繰り返し反応回数	多孔体固定化コルチゾール抗体	直接固定化コルチゾール抗体
1	525	120
2	530	55
3	511	30
4	498	23
5	490	20

〔実施例 8：メソポーラスシリカ多孔体の合成 - 2〕

100 ml のビーカーに 5.0 g (0.028 mol) の $-Na_2Si_2O_5$ （カネマイト）及び 50 ml のイオン交換水を入れ、室温で 3 時間攪拌した後、濾過して $-Na_{1.6}H_{0.4}Si_2O_5$ の沈殿物を得た。この沈殿物に 50 ml のイオン交換水を加え、均一な分散液になるまで攪拌した。これを A 液とする。

【0067】

100 ml の三角フラスコに 4.0 g (0.01 mol) のドコシルトリメチルアンモニウムブロミド（DTMA-Br）及び 50 ml のイオン交換水を入れて 60 °C で攪拌し、完全に透明液になってから、8.0 g (0.04 mol) のトリイソプロピルベンゼン（TIPB）を添加して激しく 10 分間攪拌した後、60 °C で保持した。これを B 液とする。

【0068】

上記 A 液を 250 ml 容の三口丸形フラスコに移して激しく攪拌しながら、それに 60 °C に保った B 液を徐々に添加し 80 °C まで昇温させ、続けて同温度で 3 時間恒温反応させた。次に塩酸を用いて反応液の pH を 8.5 ± 0.1 まで調整し、続けて 3 時間攪拌した。反応終了後すぐに反応物を濾過捕集し、十分に水洗した後、45 °C で 24 時間風乾させた。次いで風乾物を 550 °C で 6 時間焼成することにより有機成分を除き、白色粉末を約 4.5 g 得た。

【0069】

この白色粉末（以下、FSM という）の構造を X 線回折装置（理学社製 RAD-B）で確認し、その細孔径や表面積及び細孔総容積を N₂ 吸着装置（Autosorb）で測定した結果、FSM が前記構造ユニット（平均細孔径約 70 のほぼ均一な細孔）を備えるメソポーラスシリカ多孔体であることを確認した。

【0070】

〔実施例 9：安定化抗体の作製 - 2〕

上記の FSM 3 g を収容した容器に、前記マウスモノクローナル抗体を脱イオン水にて 10 mg/ml に希釈した液 100 ml を注加して、室温で緩やかに攪拌することにより、

10

20

30

40

50

F S Mの細孔に抗体を固定化した。こうして得られた安定化抗体 F S M (本例に係る、抗体を固定化した F S M)を濾過・水洗し、室温で乾燥させた。

【 0 0 7 1 】

〔実施例 1 0 : 安定化抗体 F S Mの溶液状態での安定化効果〕

実施例 9 で得られた安定化抗体 F S Mを用い、これを 3 7 ° C にて p H 7 . 4 のリン酸緩衝液中に 2 週間以内の所定の日数 (具体的には、表 6 に示す日数) 保存し、前記実施例 3 に準ずる方法で結合活性を測定した。対照としては可溶性の抗コルチゾール抗体を用い、抗マウス I g G 抗体をプレートに固定したものをを用いて結合活性を測定した。

【 0 0 7 2 】

測定結果を表 6 に示すが、安定化抗体 F S Mは、可溶性の抗体に比較して良好な安定性を示した。 10

【 0 0 7 3 】

【表 6】

日数	FSM固定化抗コルチゾール抗体	可溶性抗コルチゾール抗体
0	100	100
3	90	4
6	87	0
10	80	0
14	75	0

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】安定化抗体の一例を示す図である。

【図 2】免疫反応装置の一例を示す図である。

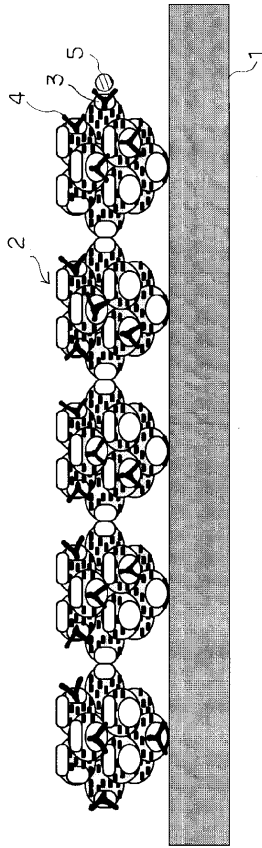
【図 3】免疫反応装置の他の一例を示す図である。

【符号の説明】

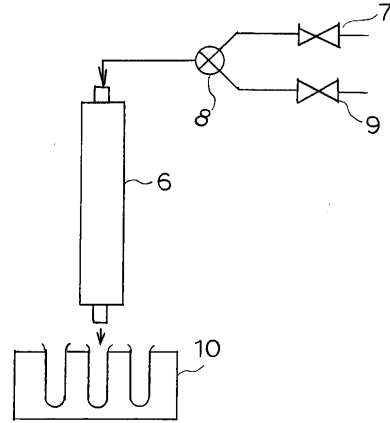
- 1 固定床
- 2 構造ユニット
- 3 細孔
- 4 抗体
- 5 抗原
- 6 アフィニティカラム
- 1 1 水晶振動子
- 1 2 容器
- 1 3 抗体
- 1 4 ラテックス粒子
- 1 5 抗原

30

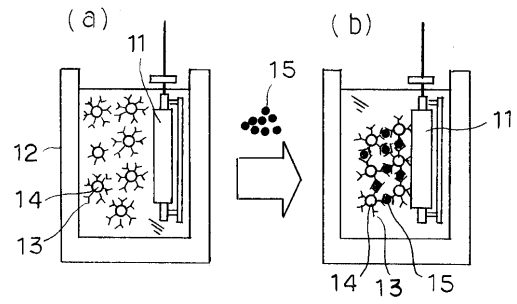
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



专利名称(译)	稳定抗体和免疫反应方法以及使用其的免疫反应装置		
公开(公告)号	JP2004083501A	公开(公告)日	2004-03-18
申请号	JP2002248087	申请日	2002-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社豊田中央研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社豊田中央研究所		
[标]发明人	浅見修 高橋治雄 山田幸生		
发明人	浅見 修 高橋 治雄 山田 幸生		
IPC分类号	G01N33/531 C07K16/00		
FI分类号	C07K16/00 G01N33/531.A B82Y15/00 B82Y30/00		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/DA75 4H045/EA50		
代理人(译)	北川修		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种具有高抗体稳定作用的抗体固定技术，以及使用该技术的免疫反应方法和免疫反应装置。 解决方案：将抗体或抗体片段固定在具有结构稳定性的结构单元中的孔径近似等于或稍大于抗体等的直径的孔中。 该结构单元优选是具有大量均匀孔径的中孔的中孔二氧化硅多孔材料。 一种利用固定化了的抗体的抗原的特异性结合反应的免疫反应方法和免疫反应装置。 [选型图]图1

