

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4517081号
(P4517081)

(45) 発行日 平成22年8月4日(2010.8.4)

(24) 登録日 平成22年5月28日(2010.5.28)

(51) Int.Cl.	F 1
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 U
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 G
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/545 Z
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/553
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D
請求項の数 8 (全 13 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2005-371003 (P2005-371003)	(73) 特許権者	301021533
(22) 出願日	平成17年12月22日 (2005.12.22)		独立行政法人産業技術総合研究所
(65) 公開番号	特開2007-171054 (P2007-171054A)		東京都千代田区霞が関1-3-1
(43) 公開日	平成19年7月5日 (2007.7.5)	(72) 発明者	栗田 僚二
審査請求日	平成20年3月27日 (2008.3.27)		茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
		(72) 発明者	丹羽 修
			茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
		(72) 発明者	平田 芳樹
			茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
		(72) 発明者	矢吹 聡一
			茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫センサ用デバイス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

標的分子の検出部を、ポリカチオン性高分子の側鎖のカチオン性基とポリアニオン性高分子の側鎖のアニオン性基のモル比が3.5:6.5~4.5:5.5となるように混合したポリカチオン性高分子とポリアニオン性高分子の混合高分子膜により被覆し、該混合高分子膜の側鎖に標的分子に対する免疫反応性結合基を結合したことを特徴とする免疫センサ用デバイス。

【請求項2】

免疫反応性結合基が標的分子に対する抗体又は抗体の抗原結合性断片であることを特徴とする請求項1に記載の免疫センサ用デバイス。

【請求項3】

ポリカチオン性高分子が側鎖にアミノ基を有するポリアミノ酸であることを特徴とする請求項1又は2に記載の免疫センサ用デバイス。

【請求項4】

ポリアニオン性高分子が側鎖にスルホン酸基を有するスチレン系重合体であることを特徴とする請求項1~3のいずれか1項に記載の免疫センサ用デバイス。

【請求項5】

標的分子の検出部を絶縁性基板の上に金属薄膜を形成し、該金属薄膜の表面を前記混合高分子膜により被覆することにより構成したことを特徴とする請求項1~4のいずれか1項に記載の免疫センサ用デバイス。

【請求項 6】

金属薄膜を金、銀、銅、アルミニウムから選択された金属により構成したことを特徴とする請求項 5 に記載の免疫センサ用デバイス。

【請求項 7】

標的分子の検出部に標的分子を含有する試料の流路を形成し、該流路の表面を混合高分子膜により被覆したことを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の免疫センサ用デバイス。

【請求項 8】

溝状の流路を形成したプラスチック基板を、該流路が絶縁性基板上に形成した金属薄膜の表面に被覆した混合高分子膜に接するようにして積層したことを特徴とする請求項 7 に記載の免疫センサ用デバイス。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体試料溶液中に存在するペプチド、タンパク等を測定する免疫センサの検出部に使用する免疫センサ用デバイスに関する。

【背景技術】

【0002】

従来、生体中のタンパク質やペプチド類を測定する方法として、これら標的分子に対する抗体等の分子認識能力を利用した免疫測定法が盛んに行われている。しかしながら、生体試料の測定においては、測定に使用するセンサの検出部表面に試料溶液中の標的としないタンパク等の非特異的な吸着が起こるために定量的な結果を得ることが困難であるという問題点があった。

20

したがって、標的としない分子の非特異的吸着を抑制し精度良く検出するためには、(1) 標的としないタンパク等の非特異的な吸着を抑制する膜をセンサの検出部分にコーティングする、或いは、(2) 前処理として、試料溶液中の血液成分を分離精製を行う、等の煩雑な操作が必要である。

【0003】

従来、タンパク等の非特異的吸着を抑制する膜に関しては、生体成分が材料表面に付着しないように疎水性の高い高分子、例えばポリテトラフルオロエチレンやポリジメチルシロキサン、ポリウレタンなどが用いられてきた(非特許文献 1)。

30

【非特許文献 1】中林宣男監修、医療用高分子材料の開発と応用、ISBN4-88231-202-6

【0004】

これとは反対に、材料表面を親水性の高い高分子、例えばポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)やポリアクリルアミドなどを用いて界面自由エネルギーの低い表面を形成し、生体成分の付着を抑制する試みも行われてきた(非特許文献 2)。

【非特許文献 2】西田、榊原、一ノ瀬、下田、今野、上村、上原、七里、石原、中林、人工臓器、1996年、25巻、144項

【0005】

生体成分を測定する免疫センサの検出部に用いられるデバイスには、疎水性膜によるコーティングでは測定対象分子の拡散が阻害され測定が困難になる場合があるため、主に親水性の膜を検出部分に固定化し、用いられてきた(非特許文献 3)。近年、ポリエチレングリコールやメタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、デキストランなど、非特異吸着を抑制可能なポリマーの分析デバイスへの応用が試みられている。

40

【非特許文献 3】カールソン、ミカエルソン、マチソン、ジャーナルオブイムノロジカルメソッド、145巻、229頁、1991年

【0006】

しかしながら、これら従来の技術では、高分子膜形成の際に有機溶媒を用いる場合や紫外線を照射し架橋等を行う必要があるものも多く、煩雑な操作を必要とする等の問題があった。近年、タンパク吸着を高効率に抑制可能な膜が開発されているものの、抗原抗体反

50

応を利用した免疫分析デバイスへ応用する際には、上記膜に抗体を固定化する必要があり、抗体を固定化するために必要な官能基が不足していたり、抗体を膜に固定化することにより本来の抗体の活性が低下してしまうという問題点があった。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、本発明はこれら従来技術の問題点を解消して、免疫センサの検出部への非特異的なタンパク吸着を抑制することができるとともに、検出部に結合された抗体等の活性を低下させることなく、安定かつ高感度で標的分子を検出することのできる免疫センサの検出部に使用する免疫センサ用デバイスを提供することを目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明では、上記課題を解決するために、次のような構成1～8を採用する。

1．標的分子の検出部を、ポリカチオン性高分子の側鎖のカチオン性基とポリアニオン性高分子の側鎖のアニオン性基のモル比が3．5：6．5～4．5：5．5となるように混合したポリカチオン性高分子とポリアニオン性高分子の混合高分子膜により被覆し、該混合高分子膜の側鎖に標的分子に対する免疫反応性結合基を結合したことを特徴とする免疫センサ用デバイス。

2．免疫反応性結合基が標的分子に対する抗体又は抗体の抗原結合性断片であることを特徴とする1に記載の免疫センサ用デバイス。

20

3．ポリカチオン性高分子が側鎖にアミノ基を有するポリアミノ酸であることを特徴とする1又は2に記載の免疫センサ用デバイス。

4．ポリアニオン性高分子が側鎖にスルホン酸基を有するスチレン系重合体であることを特徴とする1～3のいずれかに記載の免疫センサ用デバイス。

5．標的分子の検出部を絶縁性基板の上に金属薄膜を形成し、該金属薄膜の表面を前記混合高分子膜により被覆することにより構成したことを特徴とする1～4のいずれかに記載の免疫センサ用デバイス。

6．金属薄膜を金、銀、銅、アルミニウムから選択された金属により構成したことを特徴とする5に記載の免疫センサ用デバイス。

7．標的分子の検出部に標的分子を含有する試料の流路を形成し、該流路の表面を混合高分子膜により被覆したことを特徴とする1～6のいずれかに記載の免疫センサ用デバイス

30

8．溝状の流路を形成したプラスチック基板を、該流路が絶縁性基板上に形成した金属薄膜の表面に被覆した混合高分子膜に接するようにして積層したことを特徴とする7に記載の免疫センサ用デバイス。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、試料溶液中に含まれる標的分子以外のタンパク等が免疫センサの検出部へ非特異的に吸着するのを抑制することができ、免疫センサの検出部に結合された抗体等の活性を低下させることなく、安定かつ高感度で標的分子を検出することのできる免疫センサの検出部に使用する免疫センサ用デバイスを得ることができる。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明では、免疫センサの検出部に使用する免疫センサ用デバイスの標的分子の検出部を、ポリカチオン性高分子の側鎖のカチオン性基とポリアニオン性高分子の側鎖のアニオン性基のモル比が3．5：6．5～4．5：5．5となるように混合したポリカチオン性高分子とポリアニオン性高分子の混合高分子膜により被覆し、該混合高分子膜の側鎖に標的分子に対する免疫反応性結合基を結合することにより免疫センサ用デバイスを構成する。

【0011】

50

本発明において混合高分子膜を形成する高分子材料としては、液中で各々カチオン性、
或いはアニオン性を示す高分子であれば特に制限はない。

例えば、ポリカチオン性高分子としては、ポリリジン、ポリヒスチジン等のポリアミノ
酸；ポリジエチルアミノエチルメタクリレート、ポリジメチルアミノエチルアクリレート
、ポリジメチルアミノプロピルアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリジエ
チルアクリルアミド、ポリジメチルアミノエチルメタクリレート、ポリジエチルアミノエ
チルメタクリレート、ポリジプロピルアミノエチルメタクリレート、ポリジエチルアクリ
ルアミド等のアクリル系重合体；ポリアリルアミン、ポリビニルアミン、ポリエチレンイ
ミン、ポリ(N-アルキル-4-ビニルピリジニウムクロリド)、ポリビニルベンジルト
リメチルアンモニウムクロリド、が挙げられる。好ましいポリカチオン性高分子としては
、ポリリジン、ポリヒスチジン等のポリアミノ酸、特にポリリジンが挙げられる。

10

【0012】

また、ポリアニオン性高分子としては、ポリスチレンスルホン酸等のスルホン酸基を有
するスチレン系重合体、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、ポリアクリル酸、ポリ
メタクリル酸、ポリビニルスルホン酸、ポリスチレンリン酸およびポリリン酸等があげら
れる。好ましいポリアニオン性高分子としては、ポリスチレンスルホン酸の単独重合体或
いは共重合体等のスルホン酸基を有するスチレン系重合体が挙げられる。

これらの混合高分子膜を構成する高分子材料としては、市販されているものを使用す
ることができる。

【0013】

本発明の免疫センサ用デバイスは、例えば免疫センサの検出部を構成する絶縁性基板の
上に、金属薄膜を形成し、該金属薄膜の表面を上記の混合高分子膜で被覆し、カルボジイ
ミド、グルタルアルデヒド等をもちいて混合高分子膜の側鎖に標的分子に対する免疫反応
性結合基を結合することによって構成することができる。

免疫反応性結合基としては、通常は標的分子に対する抗体又は抗体の抗原結合性断片が
使用されるが、抗原を使用することもできる。

【0014】

本発明の免疫センサ用デバイスを使用して測定される測定対象分子は、抗原性を有する
ものであれば特に限定されない。具体的な測定対象分子としては、例えばサイトカインな
どのタンパク、ペプチド、多糖類、ポリヌクレオチド等が挙げられ、中でもサイトカイン
類、特にTNF- α が好ましい。サイトカインの一つであるTNF- α は、健常人の血液
中においては数pg/mL以下であるが、ガン等においてその濃度が上昇し、医療分野に
おける重要なマーカー分子である。

30

【0015】

本発明の免疫センサ用デバイスに使用する絶縁基板、及び該基板上に形成される金属薄
膜としては、免疫センサで使用する分析手法に適した材料が選択される。

例えば、表面プラズモン共鳴法による分析センサでは、絶縁性基板としてガラスやポリ
カーボネート、ポリメチルアクリレート、ポリスチレン、エポキシ樹脂、ポリオレフィン
等が使用され、金属薄膜としては、金、銀、アルミニウム、銅等の導電性を有する金属が
適している。また、水晶子マイクロバランス法による分析センサでは、絶縁性基板には結
晶性の良いガラスが適しており、金属薄膜には金、銀、アルミニウムが適している。そし
て、表面弾性波素子を用いた分析センサでは、絶縁性基板にはシリコンもしくはガラスが
適しており、金属薄膜には金、銀、銅が適している。

40

金属薄膜の表面は、上記した混合高分子膜により、部分的に或いは全面的に被覆される
。

【0016】

以下、混合高分子膜を構成するポリカチオン性高分子としてポリリジン、ポリアニオン
性高分子としてポリスチレンスルホン酸を使用する場合を例にとり、本発明の免疫センサ
用デバイスを構成する手順について説明する。

(1) ポリリジンとポリスチレンスルホン酸の水溶液をおのおの準備する。これらの高

50

分子はバッファ等に溶かしてもよいが、純水の方が溶解し易いため好ましい。

(2) つぎに、表面に金属薄膜を形成した絶縁基板を準備する。金属薄膜の厚さは、後に抗原抗体反応が形成された状態を計測するために適切な膜厚にする必要があり、例えば表面プラズモン共鳴法による免疫センサに使用するデバイスでは、50ナノメートル程度が望ましい。

(3) 上記薄膜金属上にポリリジン溶液をキャストし、直ちにポリスチレンスルホン酸を加え、そのまま基板上で乾燥させる。この時に、ポリリジンとポリスチレンスルホン酸は各々のイオン電荷により互いに結合し、不溶化され、そのまま金属薄膜上に高分子混合膜が形成される。ポリリジンとポリスチレンスルホン酸の濃度比は、例えばモノマー濃度比で4:6で混合する。ポリスチレンスルホン酸をやや過剰に混合するのは、形成される高分子混合膜をアニオン性にし、中性付近でアニオンであるタンパク質の非特異的な吸着を抑制するためである。ポリリジン及びポリスチレンスルホン酸は、単一モノマーあたり1つのカチオン性側鎖もしくは1つのアニオン性側鎖を有しているため、上記混合比がそのまま側鎖のカチオン性官能基とアニオン性官能基のモル比となるが、側鎖に複数のアニオン性もしくはカチオン性側鎖を有する場合には、側鎖の数を考慮し、カチオン性官能基とアニオン性官能基のモル比が4:6になるように混合する。

【0017】

(4) ついで、以下のようにして、標的分子(例えばTNF- α)に対する抗体(例えば抗TNF- α 抗体)を混合高分子膜に結合させる。

まず、水溶性カルボジイミド及びエチルジメチルアミノプロピルを含む溶液を混合高分子膜上加え、15分程度放置しアミノ基を活性化させた後、測定対象試料量に対して過剰或いは大過剰の抗体を上記溶液に加えて、室温で2時間程度放置し、抗体を固定化する。その後、リン酸バッファで洗浄することにより、未反応の水溶性カルボジイミド、エチルジメチルアミノプロピル及び抗体を除去する。なお、この際に、混合高分子膜に抗体の抗原結合性断片を使用することや、抗体に代えて抗原を固定化することにより、その抗体を検出するようにすることも可能である。

【0018】

本発明の免疫センサ用デバイスでは、必要に応じて標的分子の検出部に標的分子を含有する試料の流路を形成し、該流路の表面を上記混合高分子膜により被覆することによって、センサを構成するようにしてもよい。

このような流路は、例えば、溝状の流路を形成したプラスチック基板を、該流路が絶縁性基板上に形成した金属薄膜の表面に被覆した混合高分子膜に接するようにして、積層することによって構成することができる。

【0019】

このようにして得られた、本発明の混合高分子膜を有する免疫センサ用デバイスは、様々な分析装置に適用可能であるが、例えば表面プラズモン共鳴測定に使用する際には、以下のようにして標的分子を計測する。

上述した抗体結合済み混合高分子膜で覆われた金属薄膜を有するガラス基板からなる免疫センサ用デバイスを、表面プラズモン共鳴測定装置の検出部に取り付け、基板表面にバッファを導入し、バッファに対するベースラインを得る。

その後、上記バッファに、測定試料溶液を加える。この時、バッファ中に含まれる標的分子は混合高分子膜上に固定化された抗体と特異的に結合し、金属表面の屈折率が変化する。この屈折率変化を測定することにより、試料中に含まれる標的分子濃度を見積もることが可能である。

【0020】

一般に、血液や尿などの生体試料中にはタンパク(アルブミン等)が含まれている。該タンパクは非特異的に検出部表面に吸着することが知られており、通常の表面プラズモン共鳴法では、屈折率変化が特異的な反応によるものか非特異的な吸着によるものかを判断することは出来ない。しかしながら、本発明の混合高分子膜で被覆した免疫センサ用デバイスを検出部に使用した場合には、非特異的なタンパク吸着を大幅に抑制することが可能

10

20

30

40

50

であるため、屈折率変化が特異的な反応によるものだけに由来すると考えられ、正確に標的分子を定量することが可能となる。

【0021】

また、本発明の免疫センサ用デバイスを使用して水晶振動子マイクロバランス法及び弾性表面波素子により測定する際には、上述した抗体（もしくは抗原）結合済み混合高分子膜で覆われた金属薄膜を有する絶縁性基板からなる免疫センサ用デバイスを用いて同様にベースラインを得た後、測定試料溶液を加える。この時、標的分子は混合高分子膜上に固定化された抗体（もしくは抗原）と特異的に結合し金属表面の重量が変化するため、標的分子の測定を行うことが可能である。その他、免疫センサ用デバイスに蛍光標識或いは酵素標識された2次抗体を導入し、標的分子と結合したこれらの標識量を定量する免疫センサに本発明の免疫センサ用デバイスを用いることも可能であり、様々な測定手法に応用可能である。

10

【実施例】

【0022】

以下、本発明を実施例に基づいて説明するが、以下の実施例は本発明を限定するものではない。

（実施例1）

図1は、本発明の免疫センサ用デバイスの1例を示す図であり、(A)はデバイスを作製する工程を示す斜視図、また(B)はデバイスの断面模式図である。

このデバイスD1は、ガラス基板2上に形成した金属薄膜1の表面を部分的に混合高分子膜3で被覆し、この高分子膜の側鎖に標的分子に対する免疫反応性結合基として抗体を結合したものである。金属薄膜1の上には、混合高分子膜3に接するように溝状の微小流路4を設けたポリマー基板7が、金属薄膜1全体を覆うように積層されている。そして、微小流路4の両端には孔5,6を設け、試料の導入及び排出のためのキャピラリー（図示せず）を接続するよう構成されている。

20

【0023】

以下、このデバイスD1を作製する手順について説明する。

ガラス基板2（16mm x16mm、厚さ0.15mm、松浪硝子社製）上にマグネトロンスパッタ装置（日本シード社製）を用いてチタンを3nm堆積させた後、さらに金薄膜を50nm堆積させることにより金薄膜1を形成した。該金薄膜1上に直径3ミリメートルの穴を開けたシールを貼り、直径3ミリメートルの金薄膜1のみを露出させた。上記露出された金薄膜1上に、モノマー濃度換算で2.5μMのポリリジン水溶液（平均分子量8万）を4μL滴下後、直ちにモノマー濃度換算で2.5μMのポリスチレンスルホン酸水溶液（平均分子量7万）を6μL滴下した。これによりポリリジンとポリスチレンスルホン酸は、モル比で4:6で混合されたことになり、合計10μL滴下している（1.4μL/mm²）。ポリリジン及びポリスチレンスルホン酸は、単一モノマーあたり1つのカチオン性側鎖もしくは1つのアニオン性側鎖を有しているため、上記混合比がそのまま側鎖のカチオン性官能基とアニオン性官能基のモル比となる。そのまま、室温で12時間乾燥させ、金薄膜1上に混合高分子膜3を形成した。図2に上記条件で作製した混合高分子膜のAFM（原子間力顕微鏡）像を示す。混合高分子膜3は厚さ4.5ナノメートル程度と極めて薄く、平坦な丘状構造を示した。

30

40

【0024】

つぎに、混合高分子膜3を有する薄膜上に、0.4mg/mL水溶性カルボジイミド（N-ethyl-N'-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride、Pierce社製）と1.1mg/mL N-ヒドロキシスクシンイミド（Pierce社製）を含む10mMリン酸バッファを9μL滴下し、室温で15分間放置した。これにより金薄膜1上の混合高分子膜3のアミノ基を活性化した。さらに終濃度が0.1mg/mLになるように抗TNF-α抗体（マウスモノクローナル抗体、Sigma社製）を含む10mMリン酸バッファを加え、室温で2時間放置し、反応させた。上記反応により、活性化したポリリジンのアミノ基と抗TNF-α抗体のカルボキシル基を結合させ、抗体を混合高分子膜3に固定化した。その後、10mMリ

50

ン酸バッファで洗浄し、未反応の水溶性カルボジイミド、N - ハイドロキシスクシンイミド並びに抗TNF - 抗体を金薄膜1上から除去した。

【0025】

このようにして得られた抗体を固定化した混合高分子膜3を有する金薄膜1からシールをはがし、微小流路4を有するポリマー基板7に取り付けた。ポリマー基板7は、ステンレス基板にサンドブラスト加工法により形成した凸構造を有するネガパターンを鋳型としてポリジメチルシロキサン及び硬化剤を流し込み、60℃で2時間放置することにより硬化させ、その後、ポリマー基板を剥がし取ることにより作製した。微小流路4は幅1ミリメートル、深さ20マイクロメートルであった。その後ドリルにより、2カ所の穴5, 6を開け試料の導入及び排出のためのキャピラリを接続可能とした。〔図1(B)参照〕

10

【0026】

つぎに、このデバイスD1を使用して、表面プラズモン共鳴法により測定を行う手順について説明する。

上記で得られた混合高分子膜3を有するガラス基板2とポリマー基板7を貼り合わせたデバイスD1を、Handy - SPR装置(NTTアドバンステクノロジー社製)の検出部に屈折率マッチングオイル($n=1.510$, Cargille Laboratories社製)を介して取り付けた。該SPR装置を用いて混合高分子膜3を有する金薄膜1へ全反射条件で測定光8を導入し、該装置内に組み込まれたCCDカメラで反射光9の強度を測定し、表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon resonance: SPR)角の測定を行った。

20

【0027】

また、本発明にかかるタンパクへの非特異的吸着の影響評価は、以下の手順で行った。

まず、0.1Mリン酸バッファ溶液(pH7)をデバイスD1に取り付けられた試料導入用のキャピラリを通して混合高分子膜3上に導入し、ベースラインを得た。バッファの導入にはシリンジポンプ(CMA社製)を用いて、流速2 $\mu\text{L}/\text{min}$ で送液した。その後、1mg/mLの牛血清アルブミン(BSA)を含む0.1Mリン酸バッファ水溶液(pH7)を同様にシリンジポンプを用いて同流速でデバイスに導入しつつ、微小流路4内に配置された混合高分子膜3を有する金薄膜表面のSPR角度変化をSPR装置により読み取った。

【0028】

図3は、1mg/mLのBSA溶液を5分間混合高分子膜3を有する金薄膜1上に導入した際の、SPR角変化を示す図である。図3において、(c)は上記実施例1のポリリジンとポリスチレンスルホン酸がモル比で4:6で混合された混合高分子膜3を有するデバイスを使用した結果であり、(b)は上記実施例1のポリリジンとポリスチレンスルホン酸のモル比を5:5に変えて混合した混合高分子膜3を有するデバイスを使用した結果である。また(a)は、比較のために混合高分子膜を有しない金薄膜にBSA溶液を直接導入した際の、SPR角の変化の様子を示している。

30

BSA溶液を混合高分子膜が固定化されていない金薄膜上に導入した際には、(a)にみられるように、SPR角は急激に上昇し一定値を示した。この金薄膜に、再度BSAを含まないリン酸バッファを導入すると、若干SPR角は低下した。これは、弱い力により吸着している一部のBSAがはがれたためである。2度目のリン酸バッファ導入後のSPR角の変化量は114ミリ度であり、これは1.14 ng/mm²のBSA溶液吸着に相当することが知られている。

40

【0029】

一方、混合高分子膜が固定化された金薄膜上にBSA溶液を導入した際には、より緩やかで小さなSPR角度の変化が観測された。(b)にみられるように、混合高分子膜を構成するポリリジンとポリスチレンスルホン酸が5:5で混合された膜へのBSAの吸着に伴うSPR角変化は52ミリ度であり、混合高分子膜を構成するポリリジンとポリスチレンスルホン酸が4:6で混合された膜への吸着に伴うSPR角変化は4ミリ度であった〔(c)参照〕。

図4は、実施例1において、混合高分子膜を構成するポリリジンとポリスチレンスルホ

50

ン酸の混合比を変化させた際の、1mg/mLのBSA溶液に対するSPR角変化を示したものである。ポリリジンとポリスチレンスルホン酸が4.5:5.5乃至3.5:6.5に混合された混合高分子膜において、BSAの吸着は特に顕著に抑制された。

【0030】

一方、混合比が著しく異なる混合高分子膜においては、BSA溶液吸着量は、修飾しない場合とほぼ同程度であり、非特異タンパクであるBSAの吸着抑制能に乏しいといえる。ポリカチオン性高分子の側鎖のカチオン性基とポリアニオン性高分子の側鎖のアニオン性基のモル比が4:6程度で混合されることにより、混合高分子膜がアニオン性に帯電し、BSAのように中性付近でアニオンに帯電するタンパクでは、静電的な反発により非特異的な吸着が抑制されていると考えられる。本発明の混合高分子膜の形成は、2種類の水溶性ポリマーを混合後、室温で乾燥させるだけで形成することが可能であり、有機溶媒や紫外線など危険物を必要とせず、安全・簡便に形成可能であるという、従来の技術に見られない特徴を有する。

10

【0031】

次に、TNF- α 溶液を該デバイスに導入し、TNF- α と抗TNF- α 抗体の抗原抗体反応を上記混合高分子膜上でを行い、免疫センサとしての性能評価を行った。

図5は、Handy-SPR装置に取り付けた本発明の免疫センサ用デバイス上へ、試料溶液として0.1Mのリン酸バッファに溶解した1 μ M、5 μ M、10 μ MのTNF- α を導入した際の、SPR角変化を示す図である。TNF- α 濃度の上昇に伴い、SPR角変化量が大きくなっている。このことから、濃度未知のTNF- α を本発明の免疫センサ用デバイスに導入することによって、SPR角変化量から試料溶液中に含まれるTNF- α の濃度を見積もることが可能である。

20

【0032】

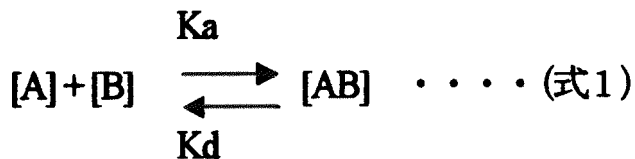
一般に、固定化された抗体は溶液中に存在する場合に比べ、活性が低下することがよく知られており、免疫測定センサにおいて、抗体の活性を低下させることなく固定化することは重要である。

今回は、表面プラズモン共鳴現象測定において反応速度定数を求める際に最も一般的なKarlssonらの報告(非特許文献3)に基づき、評価を行った。

Langmuirの1:1結合モデルにおいて、測定対象試料濃度を[A]、混合高分子膜に固定化された抗体濃度を[B]、抗原抗体反応により結合した分子濃度を[AB]、結合速度定数をKa、解離速度定数をKdとすると、

30

【数1】



であり結合した分子の生成は

$$d[AB]/dt = K_a[A][B] - K_d[AB] \quad \dots \dots (式2)$$

40

と示すことが出来る。

表面プラズモン共鳴現象測定では[AB]がSPR角度変化量(SPR)になるので、

$$d \text{ SPR}/dt = \text{Constant} - (K_a[A] + K_d) \text{ SPR} \quad \dots \dots (式3)$$

となる。

【0033】

先ず、図6(a)に示すように1 μ M~10 μ MのTNF- α 溶液を、実施例1で得られた混合高分子膜を有するデバイスに導入しSPR角度変化に対する結合速度を求めた。図6(a)において、横軸はSPR角度変化量を、縦軸はSPR角度変化量を時間で除した値である。

つぎに、図6(a)のおおのの直線の傾きをTNF- α 濃度に対してプロットすることに

50

より、図6(b)を求めた。図6(b)の傾きから、結合速度定数は 3.7×10^4 ($M^{-1} \text{ sec}^{-1}$)であった。解離速度定数は、TNF- α を導入した後、バッファを導入した解離曲線から求め、 2.5×10^{-4} (sec^{-1})であった。これらの速度定数より求めた結合定数は、 1.5×10^8 であった。これらの値は一般的な溶液中のモノクローナル抗体と同等の値を示しており、本発明による混合高分子膜上に固定化した抗体は、その結合活性を失わないことがわかった。

このように本発明にかかる混合高分子膜を有する免疫センサ用デバイスでは、測定の際に妨害物質となる生体中に存在するタンパクの非特異的吸着を大幅に抑制可能であるだけでなく、デバイスに固定化された抗体の活性を損なうことがなく、標的分子を安定かつ高感度に測定可能であり、免疫センサの検出部に使用するデバイスとして極めて有用であることが判明した。

【0034】

(実施例2)

実施例1と同様ににして、金薄膜上にポリリジンとポリスチレンスルホン酸がモル比で4:6で混合された混合高分子膜を形成した後、水溶性カルボジイミドとN-ヒドロキシスクシンイミドを用いて混合高分子膜のアミノ基を活性化した。ついで、終濃度が0.1 mg/mLになるように脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) (Phoenix Pharmaceuticals社製)を含む10 mMリン酸バッファを加え、室温で2時間放置し、反応させた。上記反応により、活性化したポリリジンのアミノ基とBNPが結合し、混合高分子膜に固定化されている。その後、10 mMリン酸バッファで洗浄し、未反応の水溶性カルボジイミド、N-ヒドロキシスクシンイミド並びにBNPを金薄膜を設けた基板上から除去した。

【0035】

つぎに、実施例1と同様にして基板を微小流路を有するポリマー基板に取り付け、免疫センサ用デバイスを作製した。そして、得られたデバイスを実施例1と同様にしてHandy-SPR装置に取り付け、表面プラズモン共鳴角の測定を行った。

図7は、上記デバイスに抗脳性ナトリウム利尿ペプチド抗体(抗BNP抗体)を、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲において導入した際のSPR角変化を示す図である。抗BNP抗体の濃度上昇に伴い、SPR角変化が大きくなっている。図8は、本発明により作製した抗BNP抗体センサ用デバイスの検量線を示すもので、横軸に抗体濃度を、縦軸にはデバイスに導入してから5分後のSPR角度を図7から読み取り、プロットすることにより作成したものである。該検量線より、抗BNP抗体濃度を見積もることが可能である。

このように、本発明にかかる免疫センサ用デバイスは、検出部を被覆した混合高分子膜に標的分子に対する抗原を固定化することにより、その抗体を検出することも可能である。すなわち、測定対象となる標的分子としては、抗原性を有するものであれば様々な分子を測定可能であり、各種分子検出への応用が可能である。

【0036】

また、図9は本発明の免疫センサ用デバイスを用いて、固定化したBNPへの親和性を見積もるために従来から広く用いられているスキャッチャードプロットを作成した際の図である。横軸には変化したSPR角変化量を、縦軸にはSPR角変化量を抗体濃度で割った商を示している。図9の傾きの逆数が結合定数であるため、本発明にかかるデバイス膜上の抗原抗体結合定数は 1.5×10^6 であり、ポリクローナル抗体として十分な結合定数を示しており、抗原や抗体を問わず、安定して本発明の混合高分子膜上に固定化可能であることを示している。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】本発明の免疫センサ用デバイスの1例を示す図である。

【図2】実施例1で金薄膜の上に形成した混合高分子膜表面の凹凸状態を原子間力顕微鏡で観察した像である。

【図3】実施例1で得られた免疫センサ用デバイスにBSA溶液を導入し、SPR角変化

10

20

30

40

50

を測定した結果を示す図である。

【図4】実施例1において、混合高分子膜を構成するポリリジンとポリスチレンスルホン酸の混合比を変化させた際の、1mg/mLのBSA溶液に対するSPR角変化を示す図である。

【図5】実施例1で得られた免疫センサ用デバイスに濃度の異なるTNF- α 溶液を導入し、SPR角変化を測定した結果を示す図である。

【図6】実施例1で得られた免疫センサ用デバイスに濃度の異なるTNF- α 溶液を導入し、SPR角変化に対する結合速度を求めた結果を示す図である。

【図7】実施例2で得られた免疫センサ用デバイスに濃度の異なる抗BNP抗体溶液を導入し、SPR角変化を測定した結果を示す図である。

【図8】本発明により作製した抗BNP抗体センサ用デバイスの検量線を示す図である。

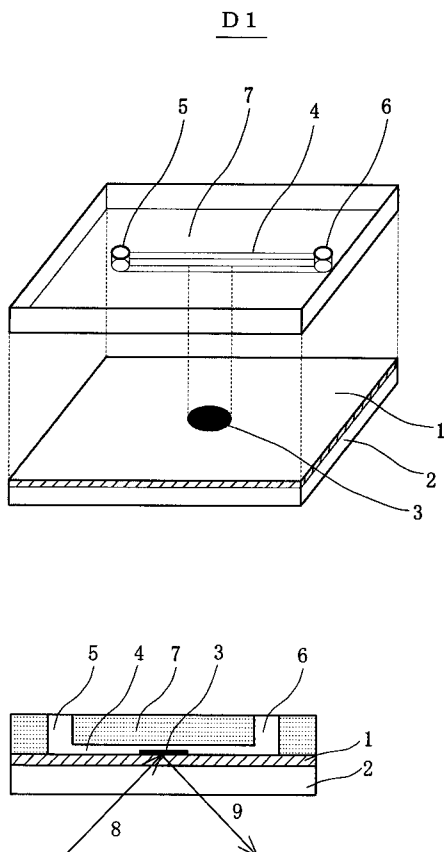
【図9】本発明の免疫センサ用デバイスのスカッチャードプロットを示す図である。

【符号の説明】

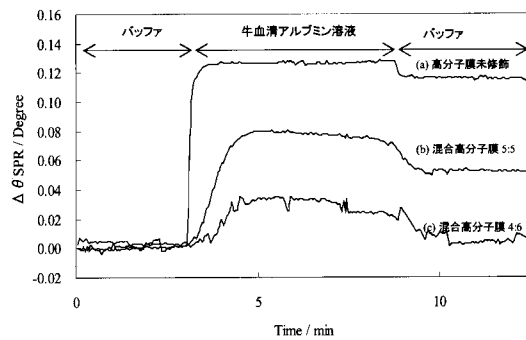
【0038】

- 1 金属薄膜
- 2 ガラス基板
- 3 混合高分子膜
- 4 微小流路
- 5 試料導入キャピラリ接続口
- 6 試料排出キャピラリ接続口
- 7 ポリマー基板
- 8 測定用光
- 9 反射光

【図1】

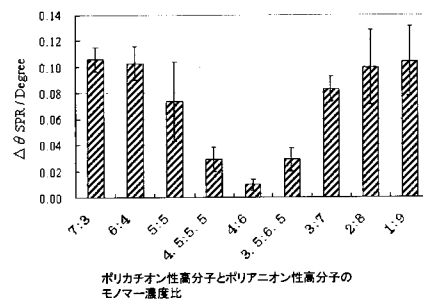


【図3】



(A)

【図4】

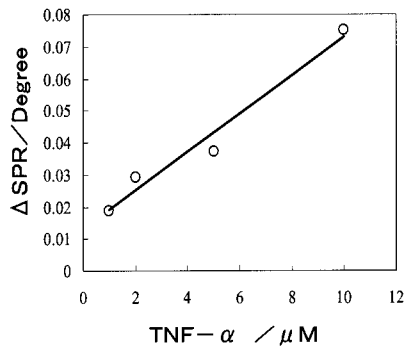


(B)

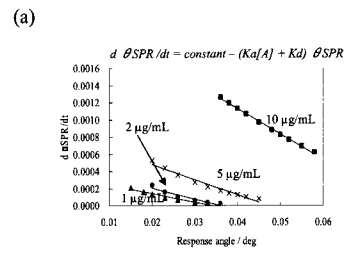
10

20

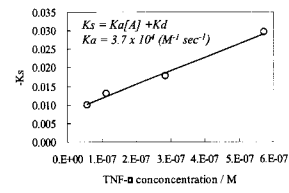
【 図 5 】



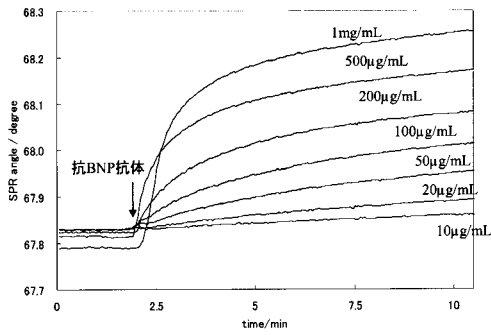
【 図 6 】



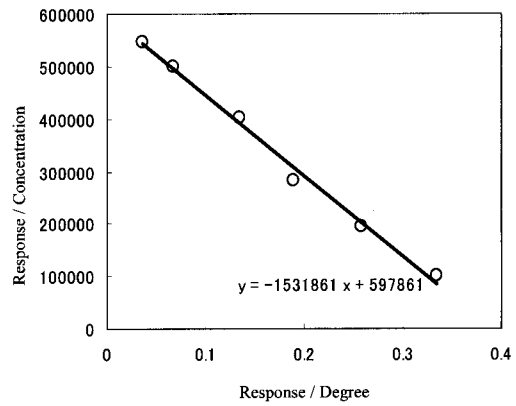
(b)



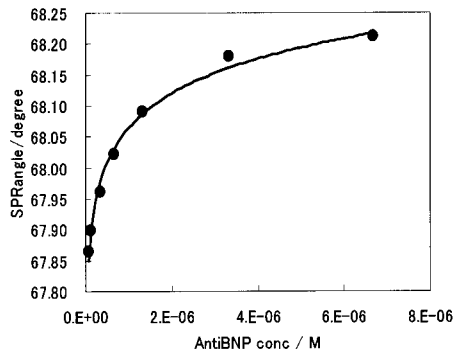
【 図 7 】



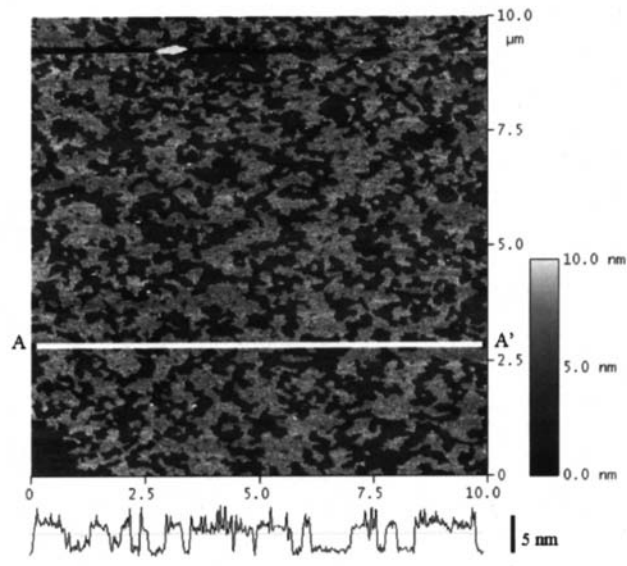
【 図 9 】



【 図 8 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 37/00 1 0 1

(72)発明者 水谷 文雄
北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所北海道センター内

(72)発明者 佐藤 緑
茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

(72)発明者 加藤 大
茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 特開2005-062074(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

G 0 1 N 3 7 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)

专利名称(译)	免疫传感器设备		
公开(公告)号	JP4517081B2	公开(公告)日	2010-08-04
申请号	JP2005371003	申请日	2005-12-22
申请(专利权)人(译)	先进工业科学和技术研究院		
当前申请(专利权)人(译)	先进工业科学和技术研究院		
[标]发明人	栗田 僚二 丹羽 修 平田 芳樹 矢吹 聡一 水谷 文雄 佐藤 緑 加藤 大		
发明人	栗田 僚二 丹羽 修 平田 芳樹 矢吹 聡一 水谷 文雄 佐藤 緑 加藤 大		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/545 G01N33/553 G01N33/53 G01N37/00		
FI分类号	G01N33/543.525.U G01N33/543.525.G G01N33/545.Z G01N33/553 G01N33/53.D G01N37/00.101		
其他公开文献	JP2007171054A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种免疫传感器用设备，用于免疫传感器的感应部分，能够抑制免疫传感器感应部分的非特异性蛋白质吸附，高灵敏度，稳定地感知目标分子而不降低结合到传感部分的抗体等的任何活性。
 SOLUTION：目标分子的传感部分涂有聚阳离子聚合物和聚阴离子聚合物的混合聚合物薄膜，聚合物聚合物薄膜的混合条件是聚阳离子聚合物的侧链阳离子基团与a的摩尔比。聚阴离子聚合物的侧链阴离子基团的范围为3.5：6.5至4.5：5.5。靶分子的免疫反应性键合基团与混合聚合物膜的侧链键合，从而形成免疫传感器用装置。之

【 図 3 】

