

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2003 - 121447

(P2003 - 121447A)

(43)公開日 平成15年4月23日 (2003.4.23)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/545			G 0 1 N 33/545	B
	33/53		33/53	U
	33/543	581	33/543	581 C
				581 J
				581 W
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 6 数)				

(21)出願番号 特願2002 - 220128(P2002 - 220128)

(22)出願日 平成14年7月29日(2002.7.29)

(31)優先権主張番号 特願2001 - 237248(P2001 - 237248)

(32)優先日 平成13年8月6日(2001.8.6)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000004178

ジェイエスアール株式会社

東京都中央区築地2丁目11番24号

(72)発明者 范 可君

東京都中央区築地二丁目11番24号 ジェイ

エスアール株式会社内

(72)発明者 俵 由香

東京都中央区築地二丁目11番24号 ジェイ

エスアール株式会社内

(72)発明者 日方 幹雄

東京都中央区築地二丁目11番24号 ジェイ

エスアール株式会社内

(54)【発明の名称】 免疫凝集反応用粒子

(57)【要約】

【課題】 、免疫凝集反応に適した診断薬粒子に関し、特に高感度でかつ保存安定性に優れた免疫凝集反応用粒子を得る。

【解決手段】 有機高分子粒子表面にストレプトアビジンが固定化され、かつビオチンとの反応性を有さない蛋白質を有し粒径が0.01 ~ 1 μ mであることを特徴とする免疫凝集反応用粒子。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 有機高分子粒子表面にストレプトアビジンが固定化され、かつビオチンとの反応性を有さない蛋白質を有し粒径が0.01～1μmであることを特徴とする免疫凝集反応用粒子。

【請求項2】 有機高分子粒子が芳香族ビニル化合物、アクリル酸エステル、メタクリル酸エステルよりなる群から選ばれる少なくとも1種のモノマーの重合体であり、かつ表面にカルボキシル基を有するものであることを特徴とする請求項1の免疫凝集反応用粒子。

【請求項3】 ビオチンを300～5000nmol/g結合することができることを特徴とする請求項1記載の免疫凝集反応用粒子。

【請求項4】 ビオチンとの反応性を有さない蛋白質がアルブミンまたはカゼインであることを特徴とする請求項1記載の免疫凝集反応用粒子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、免疫凝集反応に適した診断薬粒子に関し、特に高感度でかつ保存安定性に優れた免疫凝集反応用粒子に関する。

【従来の技術】アビジンとビオチンの反応は、高い結合常数を持ち、かつ極めて高い特異性を有することが知られており、従来、この性質を利用して、固相担体であるセルロースを用いるアフィニティークロマトカラム、ポリスチレンプレートを用いるアッセイ系等が用いられている。具体的には、アビジンを固相に固定化させ、ビオチン標識抗体、抗原、酵素等を固相と反応させることにより、アビジン・ビオチン結合を介して、または、または抗原抗体反応、及びアビジン・ビオチン結合を介してビオチン標識体を固相に固定し、目的物質の精製、免疫検定、酵素検定、核酸検定等に利用されている。これまで提案されているアビジン、またはビオチン固相体、概して固液分離用の担体として利用されている。具体的に、アビジン固定担体がビオチン標識物質を含む試料とを混合させ、アビジン・ビオチン結合を介して、ビオチン標識物質を結合し、固相化する。固相化された標的であるビオチン標識物質以外の試料組成物は固液分離により除去し、最終的に固相化されたビオチン標識物質のみが系に残る。これを回収するかまたは第2次標識体を加えて測定するような使い方がほとんどである。これらの例として、例えば、アビジン固定したアガロースビーズで詰められたカラム、或いはバッチ方式に利用されているアビジン固定磁性粒子、またはアビジン固相化マイクロプレート等が挙げられる。これら用途に於いて、固相担体は固液分離用の働きをするので、固液分離を迅速に実施できるように粒子形態を取る場合、固相担体のサイズが少なくとも数ミクロン以上がほとんどである。

【0002】一方、免疫診断担体として免疫反応シグナルを増幅する働きも兼ねるサブミクロン粒子担体にスト

レプトアビジンを結合させた診断薬用粒子が提案されている(特開昭60-80766)。この方法では、サブミクロン粒子の表面エネルギーが高いので、ストレプトアビジン固定工程での粒子が凝集し易い。これを防ぐために、粒子組成に親水性成分であるポリアクリルアミドの導入が固相の必須条件である。しかしながら、このようなポリアクリルアミド組成の固相粒子が、保存期間中に凝集したり、性能変化したりすることがある。これはポリアクリルアミドの経時的な劣化によるものであり、結果的に調製したストレプトアビジン固定粒子の性能が製造直後から経時的に変化し、最終的に凝集、性能低下に至る。このようなことから、上記方法で調製したストレプトアビジン固相担体が実用的に使えないという問題がある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、以上のような事情に基づいてなされたものであって、その目的は、長期保存に於いて粒子性能の劣化を完全に回避できるアビジンまたはストレプトアビジン固定化粒子であり、免疫診断、酵素検定、核酸検定などの検定法に有用な免疫凝集反応用粒子を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明は、有機高分子粒子表面にストレプトアビジンが固定化され、かつアルブミンおよびカゼインもしくはいずれか一方を有し、粒径が0.01～1μmであることを特徴とする免疫凝集反応用粒子を提供するものである。

【0005】

【発明の実施の形態】本発明の免疫凝集反応用粒子を構成する有機高分子粒子は、芳香族ビニル化合物、ポリアクリル酸エステル、ポリメタクリル酸エステルよりなる群から選ばれる一種のモノマーの重合体(以下、「特定重合体」という)であり、必要に応じて、不飽和カルボン酸モノマーを共重合することにより有機高分子粒子表面にカルボン酸基を導入することができる。発明において有機高分子粒子は実質的に水不溶性であり、粒子全体の80重量%以上が特定重合体よりなるものである。

【0006】前記ビニル芳香族化合物としては、スチレン、ビニルナフタレン、ビニルアントラセン、クロルスチレン、クロロメチルスチレン、メチルスチレン、ジビニルベンゼン、スチレンスルホン酸ナトリウム、など、アクリル酸エステルとしてはアクリル酸メチル、アクリル酸エチル、アクリル酸-n-ブチル、アクリル酸-2-ヒドロキシエチル、アクリル酸ポリオキシエチレン、アクリル酸グリシジル、エチレングリコールジアクリル酸エステル、アクリル酸トリプロモフェニル、アクリル酸ラウリル、アクリル酸トリデシル、アクリル酸ステアリル、アクリル酸-2-エチルヘキシル、アクリル酸シクロヘキシル、アクリル酸ベンジルなど、メタクリル酸エステルとしては、メタクリル酸メチル、メタクリ

ル酸エチル、メタクリル酸 - n - ブチル、メタクリル酸 - 2 - ヒドロキシエチル、メタクリル酸ポリオキシエチレン、メタクリル酸グリシジル、エチレングリコールジメタクリル酸エステル、メタクリル酸トリプロモフェニル、メタクリル酸ラウリル、メタクリル酸トリデシル、メタクリル酸ステアリル、メタクリル酸 - 2 - エチルヘキシル、メタクリル酸シクロヘキシル、メタクリル酸ベンジルなど、
、 - 不飽和カルボン酸モノマーとしてはメタクリル酸、アクリル酸、イタコン酸、フマル酸などを挙げることができる。これらは、単独または2種以上を組み合わせて用いることができる。本発明において有機高分子粒子としては、特にスチレン、ビニルナフタレンおよび(メタ)アクリル酸の共重合体が好適である。有機高分子粒子のうち、好適なものとしては、スチレン、メタ(ア)クリル酸の共重合体、又はスチレン、イタコン酸の共重合体、又はスチレン、メタ(ア)クリル酸、イタコン酸の共重合体、又はスチレン、メタクリル酸、アクリル酸の共重合体、又はメタ(ア)クリル酸シクロヘキシル、メタ(ア)クリル酸の共重合体、又はメタ(ア)クリル酸シクロヘキシル、イタコン酸の共重合体、又はメタ(ア)クリル酸シクロヘキシル、メタ(ア)クリル酸、イタコン酸の共重合体、又はメタ(ア)クリル酸シクロヘキシル、メタクリル酸、アクリル酸の共重合体、又はビニルナフタレン、スチレン、メタ(ア)クリル酸の共重合体、又はビニルナフタレン、スチレン、イタコン酸の共重合体、又はビニルナフタレン、スチレン、メタ(ア)クリル酸、イタコン酸の共重合体、又はビニルナフタレン、スチレン、メタクリル酸、アクリル酸の共重合体をあげることが出来る。

【0007】本発明において、有機高分子粒子は通常の重合反応により得ることができるが、窒素雰囲気下において行うことが好ましい。重合温度は、使用する重合開始剤の分解温度によっても異なるが、例えば過硫酸塩を用いる場合には75~85℃で好適に重合反応を進行させることができる。本発明において、有機高分子粒子は表面にカルボキシル基を有することが好ましいが、そのカルボキシル基の量は有機高分子粒子1gに対して0.01~0.4ミリモルであることが好ましい。カルボキシル基の量が0.01ミリモル/g未満の場合、十分なストレプトアビジンを導入することが難しく、一方、0.4ミリモル/gを超えると、カルボキシル基が粒子表面により粒子内部深さ方向に導入されることになり、ストレプトアビジンの導入反応にこれらのカルボン酸が実質的に機能しなくなる。本発明において有機高分子粒子は、非多孔質であることが好ましく、非多孔質であるビオチン標的物質との反応が粒子表面のみで起こるため、反応可能な領域を表面に限定した結果、反応時間が著しく短くなるので好ましい。

【0008】本発明において、有機高分子粒子はその粒径範囲が0.01~1μmであり、実際に利用される検出方

法、濁度の測定波長、使用装置の特性等によって、適切な粒径が選択されるが、通常、0.02~0.5μmにあることがより好ましい。有機高分子粒子の粒径が0.01未満になると数個程度の粒子凝集が通常の光学濁度測定で敏感に検知できなくなり、結果的に測定感度の低下を招くので、好ましくなく、また粒径が1μmを超えると、粒子濃度を極めて薄くしても、大きな濁度値を与えるので、結果的に測定のバックグラウンドを上げ、測定レンジを狭まるので好ましくない。

【0009】本発明において、有機高分子粒子の粒径分布値は、粒子凝集度と濁度に良い相関があるのでより均一であることが好ましく、粒径分布CV値は20%以内であることが好ましい。本発明においては有機高分子粒子にストレプトアビジンが固定化されている。本発明に利用できるストレプトアビジンはストレプトミセスアビジニイより生産されるが、遺伝子組み替え技術を用いて調製されたものを使用することができる。このように調製されたストレプトアビジンの比活性は一般的に10~30unit/mgにあり、本発明において、比活性の高いストレプトアビジンを用いることが好ましい。ストレプトアビジンは一般的に生の卵白から分離精製するアビジンに比べて特異性が高いので、免疫反応の担体である本発明にとって好ましい。有機高分子粒子にストレプトアビジンを固定化する方法としては、水または緩衝液に有機高分子粒子を分散し、1-エチル-3-(ジメチルアミノ)プロピルカルボジイミドなどの水溶性カルボジイミドやN-ヒドロキシイミドなどのカップリング剤を添加し、20~50℃で0~2時間攪拌した後、ストレプトアビジンを添加し、20~50℃で1~16時間攪拌し、有機高分子にストレプトアビジンを固定化するストレプトアビジン固定化粒子が得られる。このとき、反応液のpHは4.5~8.5が好ましい。ここで、水溶性カルボジイミドやN-ヒドロキシイミドなどの使用量は有機高分子1gあたり5~500mgである。また、ストレプトアビジンの添加量は有機高分子粒子1g当たり5~80mgであることが好ましい。ストレプトアビジンの添加量が5mg未満では、得られる免疫凝集反応粒子のビオチン結合能が低くなり、一方、添加量が80mgを超えると、免疫凝集反応粒子のビオチン結合能が飽和状態にあり、ストレプトアビジン固定化量を増やしても実質的にビオチン標識体との結合量が増えることがなく、且つ、コスト高になるので、好ましくない。

【0010】本発明の免疫凝集反応用粒子のビオチン結合能はストレプトアビジンの添加量に応じて異なるが、300~500nmol biotin/gであることが好ましい。ビオチン結合能が300nmol/g未満では、実質的に結合できるビオチン標識蛋白質、核酸等が少なくなり、高感度の測定に不向きのため、好ましくない。一方、ビオチン結合能が500nmol/gを超えるとビオチン結合能の達成に固定化されたストレプトアビジンが複層になり、表面層以外の

ストレプトアビジンは実質的に機能しないので、経済的な理由から好ましくない。

【0011】本発明においてはストレプトアビジン以外に、さらにビオチンとの反応性を有さない蛋白質、具体的にはアルブミンおよびカゼインもしくはいずれか一方が粒子表面に存在することが必要である。本発明に利用できるアルブミンの種類は特に限定するものではないが、ヒトとの免疫原性がないことから、一般的に入手しやすい牛アルブミンが好適である。また、カゼインについても、乳または豆類から分離精製されるものが利用できる。これらを遺伝子組み替え技術で製造されるものも本発明の対象である。本発明において、ビオチンとの反応性を有さない蛋白質を有機高分子粒子の表面に存在させるには、前述のとおり調製したストレプトアビジン固定化粒子の分散液に、ビオチンとの反応性を有さない蛋白質を添加し、20～50 で1～16時間攪拌する。ここで、ビオチンとの反応性を有さない蛋白質の使用量は、ストレプトアビジン固定化粒子1gに対して、通常1～500mgである。なお、ビオチンとの反応性を有さない蛋白質を有機高分子粒子の表面に導入する工程は、有機高分子粒子にストレプトアジピンを固定化する反応と同時行うこともできる。本発明において、免疫凝集反応用粒子のストレプトアビジンとビオチンとの反応性を有さない蛋白質との比率は免疫凝集反応に必要な感度に応じて変化させることができる。粒子をタンパク質で被覆するという点からみると、ストレプトアビジンとアルブミン類との合計量は20mg/粒子g以上である。本発明の免疫凝集反応用粒子の表面電荷は50～400 $\mu\text{mol}/\text{gr}$ であることが好ましい。50 $\mu\text{mol}/\text{g}$ 未満の表面荷電では、反応に供給しうるカルボン酸量が少ないため、本発明品に必要なビオチン結合能を有する粒子担体を形成することが難しいので、好ましくない。一方、表面荷電が400 $\mu\text{mol}/\text{g}$ を超えると、粒子表面が全てカルボン酸で覆われ、かつ、粒子深さ方向にもカルボン酸が伸びていく計算になる。深さ方向にあるカルボン酸が実質的にストレプトアビジンの固定化に寄与しないので、好ましくない。本発明の免疫凝集反応用粒子の屈折率は1.500～1.700であることが好ましい。これらの屈折率は診断項目によって異なるが、例えば、より高感度の凝集反応測定において、屈折率の高い粒子が好ましいが、一方、シグナルに対してバックグラウンドを低く抑える必要のある項目においては、屈折率の低い粒子であることが好ましい。上記屈折率は、上記有機高分子粒子を重合するときのモノマー組成の選択により実現することができる。

【0012】本発明の免疫凝集反応用粒子にはビオチンで標識した物質（以下、ビオチン標識体という）、例えば蛋白質、核酸、リポ多糖、脂質、糖を結合して用いる。本発明において、ビオチン標識体は、抗体、または抗原であることが好ましい。ここで、抗体としてはその形態は特に限定するものでなく、IgG、IgM、または、

IgGを切断して得られるF(ab)₂、F(ab)'断片などを用いることができる。抗原等に関しても特に限定するものではない。

【0013】また、標識体へのビオチン導入方法は通常蛋白質の修飾方法をそのまま利用することができる。例えば、千畑一郎著「アフィニティクロマトグラフィ」講談社サイエンティフィック社で開示されている方法。ビオチン誘導体としては、ビオチン-N-リンジン、ビオチンヒドラジド、2-イミノビオチン、ビオチン-N-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルのアミノ若しくはスルヒドリル誘導体、スルホスクシンイミドイミノジオチン、ビオチンプロモアセチルヒドラジド、p-ジアゾベンゾイルビオチン、3-(N-マレインイミドピロピオニル)ビオチンなどを用いることができる。

【0014】ビオチン類によってタンパク質またはオリゴヌクレオチドを修飾する方法としては、例えば、ビオチン類とN-ヒドロキシイミド類とのエステル、例えばビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミドを、タンパク質分子のアミノ基に反応させることにより、ビオチン類によってタンパク質を修飾する方法、オリゴヌクレオチドの5'末端に、フタルイミドトリエチレングリコールを結合した後、これを水酸化アンモニウムによって加水分解することにより、第一級アミノ基を形成し、このアミノ基に、例えばビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミドを結合することにより、ビオチン類によってオリゴヌクレオチドの5'末端を修飾する方法などを挙げることができるが、これらに限定されるものではなく、従来公知の種々の方法を利用することができ、適宜の方法により、ビオチン類によってオリゴヌクレオチドの3'末端を修飾することもできる。

【0015】粒子の表面に固定化されたストレプトアビジンに、タンパク質またはオリゴヌクレオチドに修飾されたビオチン類を固定化する方法としては、従来知られているストレプトアビジンにビオチン類を固定化する方法を適用することができる。例えば、リン酸緩衝液または1M塩化ナトリウム含有リン酸緩衝液中において、ストレプトアビジン粒子とビオチン標識体を室温で10分間～1時間混合した後、固液分離操作によって、未反応のビオチン標識体を除去することにより、ビオチン標識体が固定化された粒子を調製することができる。免疫凝集反応用粒子へのビオチン標識体の結合方向性を持たせるために、固定化すべきビオチン標識体には、ビオチンが一ヶ所のみを導入されていることが好ましいが、実際のビオチン導入の容易性、導入物精製、及び試薬調製の簡便性等の観点から複数箇所にビオチンが導入されていてもよい。ビオチン標識体に複数箇所のビオチンが導入されている場合には、ビオチン標識体を介するアビジンビオチン結合による粒子凝集を防ぐために、ビオチン標識体と免疫凝集反応粒子のモル比を一定範囲に制御する

必要がある。

【0016】ビオチン標識体が結合している免疫凝集反応粒子とビオチン標識体と免疫活性を有する物質と混合すると、免疫反応による結合で、粒子同士が結合し、凝集が起こる。この凝集程度を光学測定により定量し、測定すべき免疫活性物質を測定することによって免疫診断を行うことができる。本発明の検査対象となる検体は、血清、血漿、細胞溶解液、尿、汗のような生体から採取、または、排泄されるものである。また、検体から採取した検体を培養して得られる培養液も本発明の対象である。

【0017】

【実施例】以下、本発明の具体的な実施例について説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0018】また、得られた粒子の粒径および屈折率は下記のように測定した。

粒径測定

光動的散乱装置Photal LPA3100(大塚電子)を用いて実施した。36時間透析、精製した粒子を粒径測定サンプルとした。測定方法はメーカーマニュアルに従い、蒸留水で希釈した。

屈折率測定

プロピレングリコールと水を混合することにより種々の屈折率を持つ溶液を調製し、その屈折率はアッペ屈折計で測定した。この溶液に診断薬用粒子を0.01重量%となるよう分散し、ナトリウムD線により吸光度測定をおこない、吸光度が最低となる溶液の屈折率を計算によって求め、その粒子の屈折率とした。

表面荷電測定

粒子が1gを含むように原液ボトルから100mlのピーカに分注し、全体容量が80mlとなるように蒸留水を加える。約4mlの0.1NaOH標準液を加え、一定の伝導度にしてから、粒子分散液をゆっくり攪拌しながら、0.1NHClで添加し、酸・アルカリ滴定を行った。伝導度装置は(Potentiograph E536 Metrohm, Herisan社)を使用し、操作方法はメーカーマニュアルに従った。伝導度対時間の曲線変化から、粒子表面荷電を求めた。

ビオチン結合能測定

調製した免疫凝集反应用粒子をドライで1mgとなるように取り、5000pmolのLucifer yellow cadaverin標識ビオチン(Molecular probe社)を含む1MNaCl溶液1mlと混合させ、室温で30分転倒攪拌した。続いて15000rpmで5分間遠心し、粒子上澄を回収し、蛍光強度を測定した。粒子と混合前後のLucifer yellow cadaverin標識ビオチンの蛍光強度から粒子に結合されたビオチンを算出した。

【0019】 合成例1

<スチレン系重合体粒子の調製>スチレン93重量部、メタアクリル酸7重量部、水250重量部、過硫酸カリウム1重量部、ドデシルベンゼンスルホン酸0.2重量部の重合処方にて、5Lの攪拌機付ガラスフラスコを用

いて、窒素雰囲気下、温度80℃、6時間で重合を行い、ポリマー粒子を得た。重合転化率は90%以上であった。これを粒子とする。

<メタクリレート系重合体粒子の調製>シクロヘキシルメタクリレート95重量部と、メタクリル酸5重量部と、水250重量部と、過硫酸カリウム1重量部と、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム0.2重量部とを容量5リットルの攪拌機付ガラスフラスコに仕込み、窒素雰囲気下、温度80℃で6時間で重合反応を行い、ポリマー粒子を得た。重合転化率は90%以上であった。これを粒子とする。

<ナフタレン系重合体粒子の調製>ビニルナフタレン60重量部、スチレン35重量部、メタクリル酸5重量部と水250重量部、エタノール250重量部、過硫酸カリウム1重量部、ドデシルベンゼンスルホン酸0.2重量部の重合処方にて、5Lの攪拌機付ガラスフラスコを用いて、窒素雰囲気下、温度80℃、6時間で重合を行い、ポリマー粒子を得た。重合転化率は90%以上であった。これを粒子とする。

<シクロヘキシルメタクリレート系重合体粒子の調製>シクロヘキシルメタクリレート50重量部、スチレン45重量部、メタクリル酸5重量部と過硫酸カリウム1.5重量部と、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム0.3重量部を容量10Lの攪拌機付きガラスフラスコに仕込み、窒素雰囲気下、温度80℃で6時間重合を行い、ポリマー粒子を得た。重合転化率は90%以上であった。これを粒子とする。

【0020】<シクロヘキシルメタクリレート系重合体粒子の調製>シクロヘキシルメタクリレート50重量部、スチレン47重量部、アクリル酸2重量部、イタコン酸1重量部と過硫酸カリウム1.5重量部と、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム0.3重量部を容量10Lの攪拌機付きガラスフラスコに仕込み、窒素雰囲気下、温度80℃で6時間重合を行い、ポリマー粒子を得た。重合転化率は90%以上であった。これを粒子とする。

【0021】<シクロヘキシルメタクリレート系重合体粒子の調製>シクロヘキシルメタクリレート42重量部、スチレン55重量部、アクリル酸2重量部、イタコン酸1重量部と過硫酸カリウム1.5重量部と、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム0.3重量部を容量10Lの攪拌機付きガラスフラスコに仕込み、窒素雰囲気下、温度80℃で6時間重合を行い、ポリマー粒子を得た。重合転化率は90%以上であった。これを粒子とする。

【0022】実施例1

<ストレプトアビジン固定>カルボキシル基が導入された合成例1で調製した粒子、粒子、粒子の1重量%分散液1mLを、それぞれ遠心分離処理し、固形物に0.1mMHC1溶液(pH=5.5)を添加して遠心

分離処理する操作を3回繰り返すことにより、粒子の洗浄処理を行った。その後、各粒子に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド)塩酸塩(同仁化学社製)5mgを溶解した0.1mM HCl溶液0.1mLを添加し、40℃で2時間回転攪拌し、更に、ストレプトアビジン(シグマ社製)0.2mgを溶解した0.1mM HCl溶液をそれぞれ0.1mLを添加し、室温で1時間回転攪拌した後、1重量%の溶液0.1mlを加え、室温で14時間転倒攪拌することにより、それぞれの粒子の表面にストレプトアビジンを固定化したストレプトアビジン粒子を調製した。次いで、このストレプトアビジン粒子を含む溶液を遠心分離処理し、固形物(ストレプ

*トアビジン粒子)に、0.1重量%牛血清アルブミン(BSA)を含むpH7.2のリン酸塩緩衝液(PBS)(以下、緩衝液Aという)を添加して遠心分離処理する操作を3回繰り返すことにより、未反応のストレプトアビジンを除去した。そして、ストレプトアビジン粒子を、その濃度が1重量%となるよう、緩衝液Aに分散させてアビジン粒子分散液を調製した。それぞれ粒子A、粒子A、粒子A、粒子A、粒子Aとした。実施例1で調製した粒子の性能を表1および表2にまとめた。

【0023】

【表1】

	粒子①	粒子②	粒子③	粒子④	粒子⑤	粒子⑥
粒径 (nm)	320	315	310	255	260	270
表面荷電 $\mu\text{mol/g}$	150	156	145	170	175	176
屈折率 (20℃)	1.592	1.491	1.647	1.541	1.542	1.545

【0024】

* * 【表2】

	粒子①A	粒子②A	粒子③A	粒子④	粒子⑤	粒子⑥
粒径 (nm)	323	316	310	260	263	274
ビオチン結合能 $\mu\text{mol/g}$	1708	1714	1720	1780	1750	1760

【0025】実施例2

<ビオチン標識抗体の導入>ビオチン標識ラビットIgG抗体30 μg を実施例1で調製したストレプトアビジン固定免疫診断用粒子A、診断用粒子Aと診断用粒子Aの1重量%分散液100 μl を含む1M NaCl溶液と混合し、室温で30分回転攪拌した。続いてリン酸緩衝液(PBS)で2回遠心洗浄し、1%重量に再分散した。これらをそれぞれを粒子A-IgG、粒子A-IgG、粒子A-IgGとした。1重量%

の粒子A-IgGを2.5 μl とラビットIgGを含む2.5mlPBSを混合し、5秒後の吸光度A570nmを測定した。粒子A-IgG、粒子A-IgGについても、同様な評価を実施した。ラビットIgGを加えたときの粒子系のと吸光度の関係を表3にまとめた。

【0026】

【表3】

ラビットIgG濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	0	2.5	5	10	20	40
粒子①A-IgG	0.064	0.165	0.332	0.608	1.025	1.956
粒子②A-IgG	0.041	0.121	0.225	0.451	0.903	1.612
粒子③A-IgG	0.082	0.168	0.335	0.702	1.423	2.000

【0027】

【発明の効果】本発明の免疫凝集反应用粒子によれば、粒子本体の表面にストレプトアビジンまたはストレプトアビジンが固定化されているため、ビオチンによって標

識された生理活性物質を容易に導入でき、かつ、導入方法を制御することも可能のため、極めて高感度の免疫アッセイを実施することができる。

专利名称(译)	用于免疫凝集反应的颗粒		
公开(公告)号	JP2003121447A	公开(公告)日	2003-04-23
申请号	JP2002220128	申请日	2002-07-29
[标]申请(专利权)人(译)	杰瑟股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	JSR株式会社		
[标]发明人	范可君 俵由香 日方幹雄		
发明人	范可君 俵由香 日方幹雄		
IPC分类号	G01N33/545 G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/545.B G01N33/53.U G01N33/543.581.C G01N33/543.581.J G01N33/543.581.W		
优先权	2001237248 2001-08-06 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：对于适于免疫聚集反应的诊断剂颗粒，获得用于免疫聚集反应的颗粒，该颗粒特别高灵敏度并具有优异的储存稳定性。 解决方案：用于免疫聚集反应的颗粒的特征在于，抗生蛋白链菌素固定在有机聚合物颗粒的表面，并且该颗粒具有与生物素无反应性的蛋白质，粒径为0.01至1 μ m。

**【表2】

	粒子①A	粒子②A	粒子③A	粒子④	粒子⑤	粒子⑥
粒径 (nm)	323	316	310	260	263	274
比结合能 μ mol/g	1708	1714	1720	1780	1750	1760