

(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2005-315599

(P2005-315599A)

(43) 公開日 平成17年11月10日(2005.11.10)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D 2GO43
GO 1 N 21/64	GO 1 N 21/64	G 2GO54
GO 1 N 21/78	GO 1 N 21/78	C
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543	575

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2004-130860 (P2004-130860)	(71) 出願人	393002634 キヤノン化成株式会社 茨城県つくば市荊崎 1888-2
(22) 出願日	平成16年4月27日 (2004.4.27)	(74) 代理人	100075948 弁理士 日比谷 征彦
		(72) 発明者	菊池 良彦 茨城県つくば市荊崎 1888-2 キヤノン化成株式会社内
		Fターム(参考)	2G043 BA16 CA03 DA02 EA01 EA06 GA08 GB01 HA01 HA05 HA09 KA02 KA05 KA09 LA01 2G054 AA10 AB04 BB13 CA23 CB02 CB03 CE02 EA03 EB01 FA06 FA17 FA20 FA32 FB07 GA04 GB02

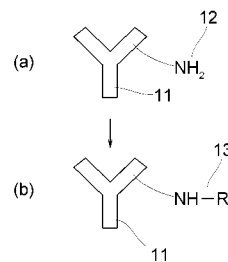
(54) 【発明の名称】 免疫法測定用プローブ及びその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 捕捉抗体と標識抗体の会合に由来する非特異吸着を抑制し、測定感度の向上を図る。

【解決手段】 測定用プローブの抗体タンパク 11 に対して遊離のアミノ残基 (NH<sub>2</sub>) 12 を置換して、その後封止のための原子団 13 を設ける処理が施されている。これにより、捕捉抗体と標識抗体の会合による非特異吸着が抑制される。

【選択図】 図 2



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

抗体タンパクを担体に固定した免疫法測定用プローブにおいて、前記抗体タンパク上のアミノ残基を置換して封止する処理を施したことを特徴とする免疫法測定用プローブ。

## 【請求項 2】

前記担体は光導波路としたことを特徴とする請求項 1 に記載の免疫法測定用プローブ。

## 【請求項 3】

前記置換により誘導される原子団は親水性かつ非塩基性であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の免疫法測定用プローブ。

## 【請求項 4】

前記原子団は官能基としてヒドロキシ基又はオキソ基を含む原子団であることを特徴とする請求項 3 に記載の免疫法測定用プローブ。

## 【請求項 5】

蛍光又は発光の検出を行う請求項 1 ~ 4 の何れか 1 つの請求項に記載の免疫法測定用プローブ。

## 【請求項 6】

抗体タンパク上のアミノ残基を置換する封止処理工程と、次いで前記抗体タンパクを担体に固定する工程とを有することを特徴とする免疫法測定用プローブの製造方法。

## 【請求項 7】

担体に対し抗体タンパクを固定する工程と、次いで前記抗体タンパク上のアミノ残基を置換する封止処理工程とを有することを特徴とする免疫法測定用プローブの製造方法。

## 【請求項 8】

前記置換は N - ヒドロキシコハク酸イミドエステルと前記アミノ残基との反応によることを特徴とする請求項 6 又は 7 に記載の免疫法測定用プローブの製造方法。

## 【請求項 9】

アミノ残基を置換して封止する処理を施した抗体タンパクを備えた請求項 1 ~ 5 の何れか 1 つの請求項に記載の測定用プローブを用いることを特徴とする免疫法測定用プローブを用いた免疫測定方法。

## 【請求項 10】

蛍光又は発光の検出を行うことを特徴とする請求項 9 に記載の免疫法測定用プローブを用いた免疫測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、タンパク、化学物質などを相応する抗体を用いて測定する免疫法測定用プローブ及びその製造方法に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

免疫法は簡便かつ選択性の高い測定法として、細菌、ウイルス、タンパク質などの検出に多用されている。その中でも、担体に固定された捕捉抗体で測定対象の抗原を捕捉し、次いでこの抗原を標識抗体でラベルするサンドイッチ法は、非特許文献 1 に記載されているように選択性や定量性を向上させ易い方法である。

## 【0003】

また、標識物質に様々な機能性物質を用いることで、検出感度の向上を図ることに適しており、ELISA法（酵素免疫法）、蛍光免疫法、化学発光免疫法などに応用されている。特に、蛍光や発光を用いる方法は、特許文献 1、2 のように光学装置と組み合わせることにより短時間で高感度な検出が行い易い。

## 【0004】

サンドイッチ法における実質的な検出限界は、抗原 - 抗体反応によらない標識抗体の吸着、所謂非特異吸着に影響を受ける。即ち、抗原量の増加に対する応答信号量の増加が鋭

10

20

30

40

50

敏であっても、非特異吸着に由来する信号以下の信号増加分は、潜在的に発生する誤差として扱われる。

【0005】

非特異吸着の一般的な形態としては、標識抗体が未被覆の捕捉抗体の担体である基材に吸着する現象があり、これに対しては、特許文献3、4のように当該反応に不活性なタンパク又は合成高分子による基材の被覆、所謂ブロッキングが行われる。

【0006】

【非特許文献1】免疫学辞典（東京化学同人）241頁

【特許文献1】特許第2012054号公報

【特許文献2】米国特許6136611号公報

【特許文献3】特許第2572267号公報

【特許文献4】特開平4-19561号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

高感度な測定、つまりより小さな信号量を扱う場合においては、基材への非特異吸着が十分に抑えられていても、なお問題となる非特異吸着が見られる場合があり、これは捕捉抗体と標識抗体の親和的会合に起因すると考えられ、これを従来のブロッキングにより抑制することは困難である。

【0008】

本発明の目的は、上述の問題点を解消し、非特異吸着を抑制した免疫法測定用プローブ及びその製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記目的を達成するための本発明に係る免疫法測定用プローブは、抗体タンパクを担体に固定した免疫法測定用プローブにおいて、前記抗体タンパク上のアミノ残基を置換して封止する処理を施したことを特徴とする。

【0010】

また、本発明に係る免疫法測定用プローブの製造方法は、抗体タンパク上のアミノ残基を置換する封止処理工程と、次いで前記抗体タンパクを担体に固定する工程とを有することを特徴とする。

【0011】

更に、本発明に係る免疫法測定用プローブの製造方法は、担体に対し抗体タンパクを固定する工程と、次いで前記抗体タンパク上のアミノ残基を置換する封止処理工程とを有することを特徴とする。

【発明の効果】

【0012】

本発明に係る免疫法測定用プローブ及びその製造方法によれば、捕捉抗体と標識抗体の会合に由来する非特異吸着を抑制し、サンドイッチ法を含む免疫法において測定感度の向上を図ることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明を図示の実施例に基づいて詳細に説明する。

本明細書で免疫法測定用プローブと称するものは、捕捉抗体が固定され、測定対象である抗原を含む検体に接触してその抗原量を測定するための不溶性担体から成る小片を指しているが、ELISA法に多用されるウェル、イムノクロマト用の短冊型シート、装置に着脱して用いられる種々の形状の部材が挙げられる。

【0014】

図1はその一例のポリスチレン製の測定用プローブ1を示し、フランジ部位2の上部にレンズ部位3が設けられ、下部に光導波路となるファイバ部位4が設けられ、ファイバ部

10

20

30

40

50

位 4 の先端は吸光塗料塗布部 5 とされている。

【 0 0 1 5 】

そして、担体となるファイバ部位 4 は抗体タンパクが固定される。抗体タンパク 1 1 は、図 2 ( a ) に示すように遊離のアミノ残基 (  $\text{NH}_2$  ) 1 2 を置換して、( b ) に示すように封止のための原子団 1 3 を設ける処理が施されている。これは抗体タンパク上 1 1 のアミノ残基 1 2 を修飾した際に、捕捉抗体と標識抗体の会合に由来する非特異吸着が抑制される現象を本発明者らが見い出したことによる。

【 0 0 1 6 】

本発明の効果を示す詳細な機構は解明されていないが、卵白アビジンとストレプトアビジンの相違のように、塩基性の強い部材で非特異吸着が起こり易いことから、抗体タンパク上の遊離アミノ基が非特異吸着の原因となることが推測され、これを封止することで効果が現れると考えられる。従って、置換原子団としては塩基性のものは避けるべきである。また、その他の会合を促進し易いものとして、極度に疎水性の高いものも避けるべきであり、親水性のものが好ましい。

10

【 0 0 1 7 】

前記の条件に好適な原子団として、ヒドロキシ基 (  $-\text{OH}$  ) 又はオキシ基 (  $=\text{O}$  ) を含むものが挙げられる。オキシ基を含むものとしては、カルボニル、アミド、イミド、ホスホリル、スルホニルなどが挙げられる。糖類 ( 単糖、オリゴ糖で塩基性でないもの )、リン酸、乳酸、ピオチン、ピルビン酸、アスコルビン酸などは、前期構造を含む生化学的成分として利用し易い。また、これらを末端に有する炭素数 6 程度までの短鎖アルキル基なども用いることができる。

20

【 0 0 1 8 】

逆に、好ましくない原子団としては、一級アミン、含窒素共役系 ( ピリジン環、イミダゾール環など ) など塩基性のものが挙げられる。親水性かつ非塩基性の原子団であっても、抗体の機能を阻害するようなものは好ましくない。例えば、立体障害の極度に大きいものが挙げられる。標識の機能に干渉しないことも重要であり、例えば蛍光標識物質に対して消光剤となるものは好ましくない。また、抗体が認識するエピトープ ( 抗原決定基 ) が好ましくないことは云うまでもない。

【 0 0 1 9 】

この測定用プローブ 1 の製造方法はとしては、( 1 ) 抗体タンパク 1 1 上のアミノ残基 1 2 を置換して封止する処理を施し、その後に抗体タンパク 1 1 をファイバ部位 4 に固定する方法と、( 2 ) ファイバ部位 4 に抗体タンパク 1 1 を固定し、その後に抗体タンパク 1 1 上のアミノ残基 1 2 を置換して封止する方法の 2 つがある。後者は固液反応のための速度的不利が考えられるが、pH や濃度の都合などで原料の抗体溶液に対する反応が行い難い場合に有用である。また、未反応の試薬や副生成物の除去が容易という利点もある。

30

【 0 0 2 0 】

なお、ファイバ部位 4 に露出部があって、これに対するブロッキングが必要な場合は、併せて公知のブロッキング操作を行うことが望ましい。

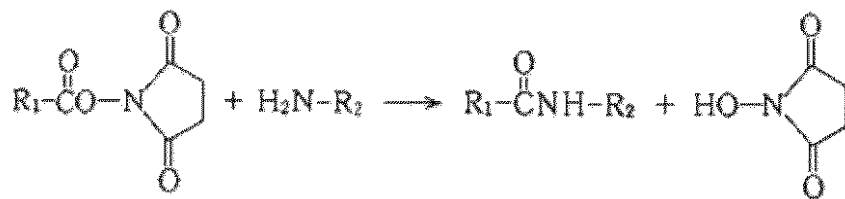
【 0 0 2 1 】

置換の方法としては、N - ヒドロキシコハク酸イミドエステルとアミノ残基との反応を用いることが好ましい。抗体タンパク上のアミノ残基の置換方法としては、種々の公知の化学反応を用いることができるが、抗体タンパクの機能を損う虞れが少ない方法として、常温付近で十分な反応が可能である次の化学式 1 に示す N - ヒドロキシコハク酸イミドエステルによる置換反応が好ましい。なお、R 1 は誘導する原子団を含む部位、R 2 は抗体タンパクである。誘導する原子団にカルボキシル基を用意しておき、適当な縮合剤により N - ヒドロキシコハク酸イミドエステルとする。

40

【 0 0 2 2 】

## 【化 1】



## 【0023】

本発明はより微小な信号の優位性が必要となる免疫測定法に対して有意義であって、蛍光又は発光の検出を行う系に対して極めて効果的である。蛍光標識や化学発光標識などを用いる手法は、色素の吸収を測定するよりも一般に高感度であるが、非特異吸着成分についても高感度に検出してしまうので、これを抑制することに意義がある。従って、本発明を組み合わせることで感度向上に対する相乗効果が得られる。

10

## 【0024】

次に、エバネッセント波励起蛍光免疫法に適用した実験例を説明する。以下の例は、本発明のより好適な形態の1つであるが、本発明の適用範囲を限定するものではない。

## 【0025】

封止処理用のN-ヒドロキシコハク酸イミドエステルは、表1に示す誘導試薬とN-ヒドロキシコハク酸イミド(過剰量)をN,N-ジメチルホルムアミドに溶解し、トリエチルアミンとジシクロヘキシルカルボジイミドを添加し、室温で縮合反応を行い、カラムクロマトグラフィにより精製して得た。

20

## 【0026】

表 1

No.	実験例 1	実験例 2	実験例 3	比較例
誘導試薬	6-アジポイル グルコース	ビオチン	パントテン酸	(封止なし)
非特異吸着信号	×	×	×	
$3 \times 10^2$ CFU/ml				×
$3 \times 10^4$ CFU/ml				×
$3 \times 10^6$ CFU/ml				

30

## 【0027】

抗体タンパクにはウサギ抗大腸菌O157:H7ポリクローナル抗体を用いた。封止処理は1mg/mlの抗体溶液(pH9.3)1mlに前記エステルのN,N-ジメチルホルムアミド溶液(5μmol/ml)125μlを加え、4で12時間攪拌することで行った。この溶液を40μg/ml、pH7.4に希釈し、実験例1~3として、この溶液に測定用プローブ1のファイバ部位4を16時間浸漬することで抗体タンパクを固定した。また、比較例として処理なし抗体タンパクを同様に固定した。これら測定用プローブ1は、念のために牛血清アルブミン溶液でブロック処理を行って使用した。

## 【0028】

蛍光標識抗体は未処理の同じ抗体タンパクに、Cy5 bisfunctional reactive dye(アマシャムバイオサイエンス社製)を用いて作製した。緩衝液はポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート(0.5質量%含むリン酸緩衝液(pH7.4))を用いた。検体はこの緩衝液にそれぞれ $3 \times 10^2$  CFU/ml、 $3 \times 10^4$  CFU/ml、 $3 \times 10^6$  CFU/mlとなるように、大腸菌O157:H7を分散させた。

40

## 【0029】

これらの測定用プローブ1の効果を確認するための検証は、図3に示す測定装置を用いて行った。即ち、測定用プローブ1を測定ポート21内の液槽部22に挿入し、フランジ部位2により固定した。測定ポート21には、液槽部22に対する送液口23、排液口24が設けられている。

## 【0030】

50

半導体レーザー光源 25 からの光 (635 nm) は、レンズ 26、ハーフミラー 27、レンズ 28 を通過して測定用プローブ 1 の上方のレンズ部位 3 から測定用プローブ 1 内に入射される。ファイバ部位 4 において励起された帰還光は、ハーフミラー 27 で水平方向に取り出され、フィルタ 29、レンズ 30 を介して分光され、フォトダイオード 31 で検出される。

【0031】

測定手順は下記の通りである。

【0032】

(1) ベースラインの測定 (3 回繰り返す)

緩衝液を液槽部 22 に注入し、測定用プローブ 1 自体の散乱及び反射に基く信号光をフォトダイオード 31 で測光する。 10

【0033】

(2) 非特異的吸着分の測定 (3 回繰り返す)

(イ)  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  の蛍光標識抗体タンパクを含む緩衝液を液槽部 22 に注入し、5 分間静置する。

(ロ) 緩衝液 2 ml を液槽部 22 に送液し、終了後の液浸状態で信号光を測光する。

【0034】

(3) 検体の測定 (低濃度から高濃度に順次連続する)

(イ) 検体 1 ml を 10 分間かけて徐々に液槽部 22 に送液する。

(ロ) 緩衝液 2 ml を液槽部 22 に送液する。 20

(ハ)  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  の蛍光標識抗体を含む緩衝液を液槽部 22 に注入し、5 分間静置する。

(ニ) 緩衝液 2 ml を液槽部 22 に送液し、終了後の液浸状態で信号光を測光する。

【0035】

これらの測定結果は表 1 に示す通りであり、表中の  $\Delta$  及び  $\times$  はそれぞれ有意か非有意かの判定を示している。この判定は非特異吸着信号についてはベースライン信号の標準偏差の 3 倍以上の増加分、検体信号については非特異吸着信号の標準偏差の 3 倍以上の増加分をもって有意とした。捕捉抗体タンパクの処理を行うことで非特異吸着信号を抑制し、より低濃度の検体を判定できることが確認された。

【0036】

また実験例 4 として、実験例 2 で使用したビオチン結合エステルの N, N - ジメチルホルムアミド溶液 ( $5 \mu\text{mol}/\text{ml}$ )  $75 \mu\text{l}$  をリン酸緩衝液 (pH 7.4)  $600 \mu\text{l}$  に混合し、この溶液に比較例と同様の封止処理をしない測定用プローブ 1 を 30 分浸漬した。 30

【0037】

ブロッキング処理は行わずに、実験例 1 ~ 3 と同様の蛍光免疫測定を行った結果、非特異吸着信号は僅かに見られたが、 $3 \times 10^4 \text{CFU}/\text{ml}$  を有意に検出することができた。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図 1】測定用プローブの側面図である。 40

【図 2】本発明の封止処理の概念図である。

【図 3】測定装置の構成図である。

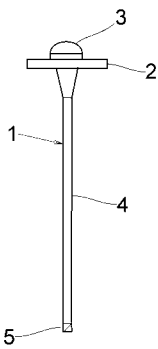
【符号の説明】

【0039】

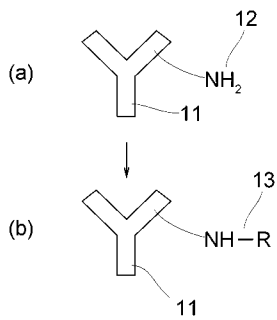
- 1 測定用プローブ
- 2 フランジ部位
- 3 レンズ部位
- 4 ファイバ部位
- 5 吸光塗料塗布部

- 1 1 抗体タンパク
- 1 2 アミノ残基
- 1 3 封止のための原子団
- 2 1 測定ポート
- 2 5 半導体レーザー光源
- 3 1 フォトダイオード

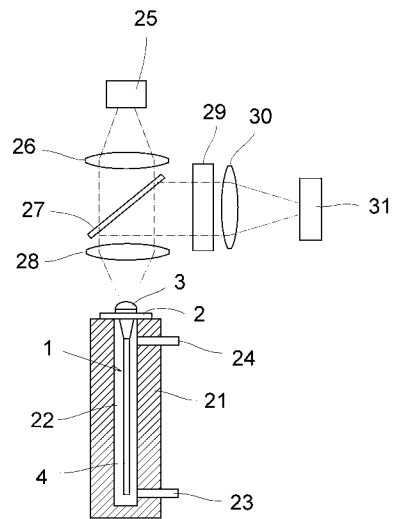
【図 1】



【図 2】



【図 3】



专利名称(译)	免疫学方法及其生产方法的探讨		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005315599A</a>	公开(公告)日	2005-11-10
申请号	JP2004130860	申请日	2004-04-27
[标]申请(专利权)人(译)	佳能化成株式会社		
申请(专利权)人(译)	キヤノン化成株式会社		
[标]发明人	菊池良彦		
发明人	菊池 良彦		
IPC分类号	G01N21/64 G01N21/78 G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.D G01N21/64.G G01N21/78.C G01N33/543.575		
F-TERM分类号	2G043/BA16 2G043/CA03 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/EA06 2G043/GA08 2G043/GB01 2G043/HA01 2G043/HA05 2G043/HA09 2G043/KA02 2G043/KA05 2G043/KA09 2G043/LA01 2G054/AA10 2G054/AB04 2G054/BB13 2G054/CA23 2G054/CB02 2G054/CB03 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/EB01 2G054/FA06 2G054/FA17 2G054/FA20 2G054/FA32 2G054/FB07 2G054/GA04 2G054/GB02		
代理人(译)	日比谷幸彦		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：通过抑制由捕获抗体和标记抗体的缔合引起的非特异性吸附来提高测量灵敏度。解决方案：测量探针的抗体蛋白11被游离氨基残基(NH)12取代，随后施加用于提供用于封闭游离氨基残基的原子团13的处理。通过该方法，抑制了由捕获抗体和标记抗体的缔合引起的非特异性吸附。Z

