

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3717735号  
(P3717735)

(45) 発行日 平成17年11月16日(2005.11.16)

(24) 登録日 平成17年9月9日(2005.9.9)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

F I

GO 1 N 33/545

GO 1 N 33/545 Z

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/53 K

GO 1 N 33/543

GO 1 N 33/53 S

GO 1 N 33/543 581G

請求項の数 5 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2000-9143 (P2000-9143)	(73) 特許権者	000000376
(22) 出願日	平成12年1月18日 (2000.1.18)		オリンパス株式会社
(65) 公開番号	特開2001-201506 (P2001-201506A)		東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号
(43) 公開日	平成13年7月27日 (2001.7.27)	(74) 代理人	100058479
審査請求日	平成15年1月30日 (2003.1.30)		弁理士 鈴江 武彦
		(74) 代理人	100084618
			弁理士 村松 貞男
		(74) 代理人	100068814
			弁理士 坪井 淳
		(74) 代理人	100100952
			弁理士 風間 鉄也
		(74) 代理人	100097559
			弁理士 水野 浩司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫固相検定用の固相担体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポリカーボネート、ポリアリレート、及びクマロン樹脂からなる群から選択されるプラスチック材料を用いて作成された免疫固相検定用の固相担体であって、抗体または抗原となり得る物質による結合を介して、被検物質に対する特異親和性物質を前記固相担体に固定化するためのバインダー物質を、表面処理を実質的に行うことなく直接吸着させたことを特徴とする固相担体。

【請求項2】

前記バインダー物質がレクチンであることを特徴とする請求項1に記載の固相担体。

【請求項3】

前記特異親和性物質が、免疫学的活性、遺伝学的活性、生化学的活性のいずれかの活性を有するものであることを特徴とする請求項1または2に記載の固相担体。

【請求項4】

前記固相担体がガラス上に前記プラスチック材料を薄膜化したものであることを特徴とする請求項1に記載の固相担体。

【請求項5】

請求項1～4の何れか1項に記載の固相担体であって、形状がシャーレ、マイクロプレート、キュベット、フィルム、ビーズ、多孔性フィルター、細径チューブ、棒、又は針の何れかである固相担体。

【発明の詳細な説明】

## 【 0 0 0 1 】

## 【 発明の属する技術分野 】

本発明は、免疫固相検定用の固相担体に関する。

## 【 0 0 0 2 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

EIA、RIA、MPHA法等の免疫検定は、抗原抗体反応を利用して検体中の物質を特異的に検出、定量する方法である。特に、抗体又は抗原を吸着させた固相を用いる免疫固相検定は、ELISAを中心に、臨床検査の分野等で汎用されている。

## 【 0 0 0 3 】

免疫固相検定用の固相には、ポリスチレン(PS)、ポリ塩化ビニル(PVC)が多用されており、吸着能を向上させるために、固相プレート表面には、コーティング処理を施すのが通常である。

10

## 【 0 0 0 4 】

従来、固相には直接抗体を固定化するのが通常であったが、近年、レクチンや接着タンパク質等のように特異的又は非特異的にある種の物質を結合し得る物質（以下バインダー物質）を介して抗体又は抗原を固相に吸着させる方法が用いられるようになってきており、これによって、多様な物質を固相に吸着させることが可能となった。とりわけ、レクチンは、各種類毎に特異的な糖鎖を結合するという特性を有しているため、赤血球抗原等を固相に吸着させるためのバインダー物質として極めて有用であり（特開平2-124464参照）、多くの免疫固相検定で使用されるに至っている。

20

## 【 0 0 0 5 】

このように、最近では、固相プレート上にバインダー物質を吸着して用いることが多くなっているが、従来の固相プレートは、抗体を効率的に吸着し得るように作成されているので、抗体以外の物質に優れた吸着能を有するものは少ない。

## 【 0 0 0 6 】

このため、バインダー物質、特にレクチンに対する吸着能が優れた固相プレート材料の開発及び探索、並びに固相プレート材料への吸着方法の開発が盛んに行われているが、必ずしも良好な結果は得られていない。また、固相プレートは、再使用が困難であるにもかかわらず、従来の固相プレートは吸着能を高めるために特別な表面処理を施しているため、固相プレート自体が高価なものとなり、コスト高な利用を余儀なくされる。

30

## 【 0 0 0 7 】

例えば、磁性マーカー粒子を用いた免疫学的測定方法を開示する特開平2-124464の実施例には、レクチンを介して赤血球が固定化されたプレートの作成、及び該プレートを用いた血液型の判定法が記載されている。

## 【 0 0 0 8 】

該実施例では、ポリスチレン製のU字型マイクロプレート（Nunc.社）にレクチンを吸着させているが、材質及び形状ともにレクチンの吸着には適していない。

## 【 0 0 0 9 】

また、レクチンを固相プレートに固定化する方法として、特開平8-319300は、糖鎖高分子を用いて固定化する方法を開示している。該方法では、まず糖鎖高分子を固相プレートに物理吸着させ、該糖鎖高分子を介して固相基材にレクチンを結合させる。固相担体に物質を吸着させる方法には、物理吸着による方法と化学的に共有結合させる方法があるが、該方法では、操作が煩雑な共有結合法を用いずに、物理吸着のみを用いている。また、糖鎖はレクチンを強固に吸着し得るので、結合力が弱いという物理吸着の一般的な欠点も克服されている。

40

## 【 0 0 1 0 】

しかし、該方法では、糖鎖高分子を固相基材に物理吸着させる操作が一段階必要であり、直接レクチンを強固に吸着し得る固相用基材を提供するものではない。

## 【 0 0 1 1 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

50

本発明は、従来技術に存するこのような欠点を克服するためになされたものであり、バインダー物質を直接物理的に吸着させるための免疫固相検定用の固相担体を提供することを目的とする。

【0012】

とりわけ、本発明は、レクチンを直接吸着させるための固相担体を提供することを目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために、本発明は、ポリブタジエン、ポリスチレンブタジエン、ポリカーボネート、ニトロセルロース、HIPS、ポリアリレート、及びクマロン樹脂からなる群から選択されるプラスチック材料を用いて作成された免疫固相検定用の固相担体であって、抗体又は抗原を固相担体に固定化するバインダー物質を直接吸着させるための固相担体を提供する。

10

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明は、バインダー物質を直接物理的に吸着させるための免疫固相検定用の固相担体を提供する。

【0015】

本明細書において、「免疫固相検定」とは、試料中の所望の検出すべき被検物質に対して特異的な親和性を有する特異親和性物質を固相に吸着させて、この固相との特異親和性に基いて被検物質を検出する固相検定において、免疫学的に抗体又は抗原となり得る物質との抗原抗体反応による結合を介して固相への吸着を強化させるようにしたものをいう。ここで、特異親和性物質は、抗体又は抗原であり得、固相に吸着させる際の抗原抗体反応によって直接的に吸着させることができ、例えば粒子凝集法、混合凝集法、及び固相酵素免疫検定法(ELISA)等があげられる。また、特異親和性物質は、遺伝学的活性、生化学的活性などの非免疫学的活性を有するものでもよく、この場合には抗原としての結合性を利用して抗原抗体反応により固相に吸着させるか、あるいは特異親和性物質に対応する抗体を固相に吸着させて、この吸着させた抗体を介して抗原抗体反応により二次的に固相に吸着させることができ、これによって、例えば酵素活性度や核酸ハイブリダイゼーションによる生化学的ないし遺伝学的検定を実施することができる。

20

30

【0016】

本発明の固相担体は、ポリブタジエン、ポリスチレンブタジエン、ポリカーボネート、ニトロセルロース、HIPS、ポリアリレート、及びクマロン樹脂からなる群から選択されるプラスチック材料を用いて、周知の方法により作成される。

【0017】

本発明の固相担体の形状は、実施すべき免疫検定の種類に応じて、シャーレ、マイクロプレート、キュベット、フィルム、ビーズ、多孔性フィルター、細径チューブ、棒、針等であり得る。

【0018】

本発明の固相担体に吸着させるべき物質は、バインダー物質である。

40

【0019】

ここで、「バインダー物質」とは、抗体又は抗原と固相担体の間に介在して、抗体又は抗原を固相担体に固定化するための、抗体又は抗原に対して親和性を有する物質を意味し、例えば、タンニン、レクチン、バルサム等の植物系粘着物質があげられる。

【0020】

本発明において好ましいバインダー物質は、小麦、大豆等から得られる植物凝集素としてのレクチンであり、コムギ胚芽凝集素(WGA)が特に好ましい。

【0021】

バインダー物質には、抗体又は抗原を結合させるが、レクチンをバインダー物質として用いるときには、赤血球を結合せしめるのが好ましい。

50

## 【 0 0 2 2 】

本発明の固相担体には、バインダー物質は物理的に吸着させる。バインダー物質を固相担体に吸着させるには、担体材料上にバインダー物質を含有する溶液を適用した後、適当な時間インキュベートすればよい。

## 【 0 0 2 3 】

以下、実施例に従って本発明を詳述する。

## 【 0 0 2 4 】

## [ 実施例 1 ]

本実施例では、様々なプラスチック材料のWGA吸着能を調べた。

## 【 0 0 2 5 】

本実施例で用いたプラスチック材料は、下表のとおりである。

## 【 0 0 2 6 】

## 【 表 1 】

プラスチック材料	製造元	製品名
ポリブタジエン	アルドリッチ	
ポリサルホン	アルドリッチ	
ポリスチレン-ブタジエン	アルドリッチ	
ポリビスフェノール A-カーボネート	アルドリッチ	
ポリスチレン	アルドリッチ	
酢酸セルロース	アルドリッチ	
エチルセルロース	和光純薬	
ポリ塩化ビニル (PVC)	ナカライテスク	
ニトロセルロース	ナカライテスク	
HIPS	旭化成	スタイロン H8601 ABS
ポリサルホン	帝人	Udel ポリサルホン p-1700NT11
ポリカーボネート	帝人化成	パンライト L1225, L1250
酢酸セルロース	ダイセルクラフト	アセチ 550
スチレン-ブタジエン [HIPS]	旭化成	アサフレックス AFX805
ポリアリレート	ユニチカ	U ポリマーU-100
ポリエチレンテレフタレート [PET]	東洋紡	パイロペット
クマロン樹脂	新日鉄化学	エスクロン V-120
ポリスチレンプレート	Nunc 社	Microwellplate262162
ポリプロピレンマイクロプレート	コーニング	コースター

## 【 0 0 2 7 】

本実施例では、赤血球がWGAを結合する能力を利用して、赤血球の結合状態を調べることによって各プラスチック材料のWGA吸着能を評価している。

## 【 0 0 2 8 】

上記各プラスチック材料上へのWGAの吸着は、以下のように行った。

## 【 0 0 2 9 】

各プラスチック材料の中で、テトラヒドロフラン (THF) に溶解するものは、約5%の濃度に溶解し、スライドガラスに100  $\mu$ L滴下して、カバーガラスを用いて素早くガラス面に伸ばし、スライドガラス上にプラスチック薄膜を形成した。

## 【 0 0 3 0 】

THFに溶けない板状の材料、及びマイクロプレートは、そのまま使用した。

## 【 0 0 3 1 】

形成したプラスチック薄膜、及び該板状の材料に、ドーナツ状に穴の空いたビニールパッチ (コクヨ ビニールパッチクリア) を貼り、50  $\mu$ Lの10  $\mu$ g/mL WGA(0.01M炭酸緩衝液pH9.6中に溶かしたものを)をその中に分注した。続いて、室温で1時間インキュベートして、0.05% Tween 80 / 純水で洗浄した。

## 【 0 0 3 2 】

マイクロプレートのもは、50  $\mu$ Lの10  $\mu$ g/mL WGA(0.01M炭酸緩衝液pH9.6中に溶かしたも

10

20

30

40

50

の) をウェルに分注して、同様に処理した。

【 0 0 3 3 】

このようにしてWGAを吸着せしめた各プラスチック材料に、生理食塩水で1.0%に希釈した洗浄O型赤血球を25 $\mu$ L/ウェルになるように分注し、室温で10分間静置した。その後、生理食塩水で洗浄して、赤血球の結合を観察した。

【 0 0 3 4 】

結果を表2に示す。

【 0 0 3 5 】

【表2】

樹脂名	赤血球結合
ポリブタジエン (アルドリッチ)	+++
ポリサルホン (アルドリッチ)	-
ポリスチレン-ブタジエン (アルドリッチ)	+++
ポリカーボネート (アルドリッチ)	+++
ポリスチレン (アルドリッチ)	-
酢酸セルロース (アルドリッチ)	-
エチルセルロース (和光純薬)	-
ポリ塩化ビニル (ナカライテスク)	-
ポリエーテルスルホン PES1010 (三井東圧)	++
ポリエーテルスルホン PES2010 (三井東圧)	++
ポリスチレン PS MW-1 (デンカ工業)	+
ポリスチレン PS GP-1 (デンカ工業)	++
ポリスチレン PS MT-5 (デンカ工業)	++
ニトロセルロース (ナカライテスク)	+++
HIPS スタイロン (旭化成)	+
ポリサルホン Udel ポリサルホン (帝人)	+
ポリカーボネート パンライト L1225 (帝人化成)	+++
ポリカーボネート パンライト L1250 (帝人化成)	+++
酢酸セルロース アセチ 550 (ダイセルクラフト)	-
HIPS アサフレックス AFX805 (旭化成)	+++
ポリアリレート ポリマーU-100 (ユニチカ)	+++
ポリエチレンテレフタレート [PET] パイロペット (東洋紡)	-
クマロン樹脂 エスクロン V120 (新日鉄化学)	+++
ポリスチレンプレート 262162 (Nunc 社)	-
ポリプロピレンマイクロプレート (コーニング)	-

- : 殆ど結合なし

十 : 結合しているが大きく剥離している部分がある

++ : モノレイヤーを形成しているが、全体に白っぽい

+++ : 均一なモノレイヤーで金属的光沢がある

【 0 0 3 6 】

表2から明らかなように、赤血球が良好に固相したプラスチック材料は、ポリブタジエン (アルドリッチ)、ポリスチレン-ブタジエン (アルドリッチ)、ポリカーボネート (アルドリッチ)、ニトロセルロース (アルドリッチ)、ポリカーボネート (帝人化成 パンライト)、HIPS (旭化成 アサフレックス AFX805)、ポリアリレート (ユニチカ ポリマーU-100)、クマロン樹脂であった。

【 0 0 3 7 】

この中でも特に赤血球の結合が良好なものは、ポリカーボネート、ポリアリレート、クマ

10

20

30

40

50

ロン樹脂であった。

【0038】

以上の結果から、これらのプラスチック材料は優れたWGA吸着能を有すること、WGAを介して赤血球を強固に結合し得ることが示された。これらのプラスチック材料は、赤血球を用いた血液型判定試験に適しているであろう。

【0039】

[実施例2]

本実施例では、実施例1においてWGAの結合が良好であったポリカーボネート（帝人化成パンライト）及びポリアリレート（ユニチカ ポリマーU-100）を用いてU底マイクロプレートを成形し、WGAの固相状態の比較を行った。

【0040】

対照には、従来WGAを吸着させるために用いられてきたNunc社Maxisorp（Cat. No. 475078）、Nunc社Polysorp（Cat. No. 475086）、Nunc社Microwellプレート（Cat. No. 262170）を使用した。

【0041】

まず、5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.31, 0.15  $\mu\text{g}$ /ウェルになるように、0.01Mの炭酸緩衝液pH 9.6で、WGA（生化学工業 Cat. No. 300191, Lot. No. 62404）を希釈し、室温で1時間インキュベートした。

【0042】

その後、0.05% Tween 80 / 純水で洗浄した。

【0043】

洗浄後、ウェルに市販のO型スクリーニング赤血球（Orthoセレクトジェン）を生理食塩水で約1%に希釈して分注し、静置して赤血球を固相した。余剰赤血球は、生理食塩水で洗浄除去した。

【0044】

赤血球結合後、赤血球結合を肉眼観察し、その後100  $\mu\text{L}$ /ウェルの精製水を分注して溶血せしめ、OD410nmで溶血を測定する。得られた溶血値を赤血球の結合量とした。

【0045】

結果を図1及び表3に示す。

【0046】

【表3】

	0.15	0.31	0.625	1.25	2.5	5
Nunc. Maxisorp	-/-	+/-	+++/+	+++/+	+++/+	+++/+
Nunc. Polysorp	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-
Nunc. Microwell	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
PC	-/-	-/-	+++/+	+++/+	+++/+	+++/+
PAr	-/-	+/-	+++/+	+++/+	+++/+	+++/+

肉眼判定／顕微鏡判定

#### 赤血球結合像判定凡例

判定結果	肉眼判定	顕微鏡判定
-	殆ど結合なし	
+	結合しているが大きく剥離している部分がある	すきまがある
++	モノレイヤーを結合しているが全体に白っぽい	やや凹凸がある
+++	均一なモノレイヤーで金属的光沢がある	均一な石畳状の赤血球結合

【0047】

図1に示されているように、ポリカーボネート（PC）及びポリアリレート（PAr）は、特

10

20

30

40

50

別な表面処理を施していないにもかかわらず、従来レクチンを吸着させるための固相担体として使用されてきたNunc社のMaxisorpと同等の赤血球結合能を有していた。

【0048】

Nunc.社のMicrowellは、これらのプラスチック材質に比べて、明確に赤血球結合能が劣っており、Polysorpは殆ど赤血球を結合しなかった。

【0049】

表3は、各濃度における、それぞれのプラスチック材質の赤血球結合状態を肉眼判定及び顕微鏡判定した結果である。

【0050】

表3の結果も、図1に示されている結果と同様であり、ポリカーボネートとポリアクリレートは、1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で極めて良好に赤血球を固相していた。

10

【0051】

なお、上述した例に限定されず、例えば、抗体を介して核酸や酵素等の遺伝的又は生化学的物質を固相化して検定を行う場合も本発明に含まれる。

【0052】

【発明の効果】

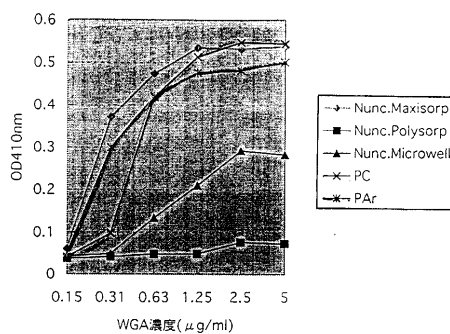
本発明によって、ポリブタジエン、ポリスチレンブタジエン、ポリカーボネート、ニトロセルロース、HIPS、ポリアリレート、及びクマロン樹脂は、レクチンを良好に吸着させることができ、レクチンを固定化するための担体として適していることが明らかとなった。これらの樹脂は、レクチンの固定化に適した唯一の固相担体として従来から用いられてきたNunc社のMicrowellと同等のレクチン吸着能を有しており、特別な表面処理を施す必要がなく、安価に固相免疫検定を実施できる。

20

【図面の簡単な説明】

【図1】各種プラスチック材料のレクチン吸着能力を比較した結果を示す図。

【図1】



---

フロントページの続き

(72)発明者 玉井 豊広

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 オリンパス光学工業株式会社内

審査官 加々美 一恵

(56)参考文献 特開平09-297138(JP,A)

特表平11-505327(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, DB名)

G01N 33/48-33/98

专利名称(译)	用于免疫固相测定的固相载体		
公开(公告)号	<a href="#">JP3717735B2</a>	公开(公告)日	2005-11-16
申请号	JP2000009143	申请日	2000-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	奥林巴斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	オリンパス光学工業株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	奥林巴斯公司		
[标]发明人	玉井豊広		
发明人	玉井 豊広		
IPC分类号	G01N33/545 G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/545.Z G01N33/53.K G01N33/53.S G01N33/543.581.G		
代理人(译)	坪井淳 水野浩二		
其他公开文献	JP2001201506A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供对粘合剂物质，特别是凝集素具有优异吸附能力的固相材料。 解决方案：为了实现上述目的，本发明涉及使用选自聚丁二烯，聚苯乙烯丁二烯，聚碳酸酯，硝化纤维，HIPS，聚芳酯和香豆酮树脂的塑料材料生产的固体材料的制备方法。提供相载波。

樹脂名	赤血球結合
ポリブタジエン(アルドリッチ)	+++
ポリサルホン(アルドリッチ)	-
ポリスチレン-ブタジエン(アルドリッチ)	+++
ポリカーボネート(アルドリッチ)	+++
ポリスチレン(アルドリッチ)	-
酢酸セルロース(アルドリッチ)	-
エチルセルロース(和光純薬)	-
ポリ塩化ビニル(ナカライテスク)	-
ポリエーテルスルホン PES1010(三井東圧)	++
ポリエーテルスルホン PES2010(三井東圧)	++
ポリスチレン PS MW-1(デンカ工業)	+
ポリスチレン PS GP-1(デンカ工業)	++
ポリスチレン PS NT-5(デンカ工業)	++
ニトロセルロース(ナカライテスク)	+++
HIPS スタイロン(旭化成)	+
ポリサルホン Udel(帯人)	+
ポリカーボネート バンライト L1225(帯人化成)	+++
ポリカーボネート バンライト L1250(帯人化成)	+++
酢酸セルロース アセチ 550(ダイセルクラフト)	-
HIPS アサフレックス AFX805(旭化成)	+++
ポリアリレート ポリマー-U-100(ユニチカ)	+++
ポリエチレンテレフタレート[PET] バイロベット(東洋紡)	-
クマロン樹脂 エスクロン V120(新日鉄化学)	+++
ポリスチレンプレート 262162(Nunc 社)	-
ポリプロピレンマイクロプレート(コーニング)	-