

(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2006-47255

(P2006-47255A)

(43) 公開日 平成18年2月16日(2006.2.16)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/543</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 O 1 J	
GO 1 N 33/531	(2006.01)	GO 1 N 33/531	B	

審査請求 未請求 請求項の数 32 O L (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2004-239877 (P2004-239877)	(71) 出願人	000195524
(22) 出願日	平成16年8月19日 (2004. 8. 19)		生化学工業株式会社
(31) 優先権主張番号	特願2003-296005 (P2003-296005)		東京都千代田区丸の内一丁目6番1号
(32) 優先日	平成15年8月20日 (2003. 8. 20)	(74) 代理人	100124512
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 堀口 努
(31) 優先権主張番号	特願2004-93863 (P2004-93863)	(72) 発明者	石丸 剛
(32) 優先日	平成16年3月26日 (2004. 3. 26)		東京都東大和市狭山4丁目1489-16
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	官浦 修一
(31) 優先権主張番号	特願2004-197049 (P2004-197049)		神奈川県横浜市青葉区美しが丘4-36-21
(32) 優先日	平成16年7月2日 (2004. 7. 2)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

(54) 【発明の名称】 安定化剤及びブロッキング剤

(57) 【要約】

【課題】

特異的結合対形成物質の保存において、その安定性を高めるための新規な安定化剤、及び特異的結合対形成物質を用いる測定に使用するための新規な非特異的吸着のブロッキング剤を提供する。

【解決手段】

植物由来のポリペプチドを有効成分として含有する特異的結合対形成物質の安定化剤、特異的結合対形成物質を用いる測定における非特異的吸着のブロッキング剤、特異的結合対形成物質と前記安定化剤又は前記ブロッキング剤とを含む特異的結合対形成物質を用いる測定のための組成物、及び安定化剤又は非特異的吸着のブロッキング剤を含む特異的結合対形成物質を用いる測定のためのキット。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

植物由来のポリペプチドを有効成分として含有する、特異的結合対形成物質の安定化剤。

## 【請求項 2】

特異的結合対形成物質が、生体内物質の測定に使用するものである、請求項 1 記載の安定化剤。

## 【請求項 3】

特異的結合対形成物質が、抗体、抗原又は核酸である、請求項 1 記載の安定化剤。

## 【請求項 4】

「植物由来のポリペプチド」が、「植物由来のタンパク質」を分解して得られうるポリペプチドであることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の安定化剤。 10

## 【請求項 5】

「植物」が、「農作物」であることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の安定化剤。

## 【請求項 6】

「植物」が、大豆、小豆、インゲン豆、ソラ豆、アーモンド、ピーナッツ、小麦、トウモロコシ、ジャガイモ及び米から選択される何れかの植物であることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の安定化剤。

## 【請求項 7】

タンパク質がグリアジン、ツェイン、グルテニン、グルテン、ホルデイン、オリゼニン、グリシニン、パタチン及びコングリシニンからなる群から選択される一以上のタンパク質であることを特徴とする、請求項 4 記載の安定化剤。 20

## 【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の安定化剤と、アルカリ又は緩衝液とを含む、安定化剤組成物。

## 【請求項 9】

無菌濾過された溶液であって、pH3.0 ~ 9.0であることを特徴とする、請求項 8 記載の安定化剤組成物。

## 【請求項 10】

免疫学的測定用である、請求項 8 又は 9 に記載の安定化剤組成物。 30

## 【請求項 11】

核酸プローブ用又は核酸チップ用である、請求項 8 又は 9 に記載の安定化剤組成物。

## 【請求項 12】

植物由来のポリペプチドを有効成分として含有する、特異的結合対形成物質を用いる測定における非特異的吸着のブロッキング剤。

## 【請求項 13】

「植物由来のポリペプチド」が、「植物由来のタンパク質」を分解して得られうるポリペプチドであることを特徴とする、請求項 12 記載のブロッキング剤。

## 【請求項 14】

植物が、「農作物」であることを特徴とする、請求項 12 又は 13 記載の記載のブロッキング剤。 40

## 【請求項 15】

「植物」が、大豆、小豆、インゲン豆、ソラ豆、アーモンド、ピーナッツ、小麦、トウモロコシ、ジャガイモ及び米から選択される何れかの植物であることを特徴とする、請求項 12 ~ 14 のいずれかに記載のブロッキング剤。

## 【請求項 16】

タンパク質が、グリアジン、ツェイン、グルテニン、グルテン、ホルデイン、オリゼニン、グリシニン、パタチン及びコングリシニンからなる群から選択される一以上のタンパク質であることを特徴とする、請求項 13 記載のブロッキング剤。

## 【請求項 17】

特異的結合対形成物質の安定化効果を有する、請求項 12 ~ 16 のいずれかに記載のブロッキング剤。

【請求項 18】

特異的結合対形成物質が、生体内物質の測定に使用するものである、請求項 17 記載のブロッキング剤。

【請求項 19】

特異的結合対形成物質が、抗体、抗原又は核酸である、請求項 17 記載のブロッキング剤。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の安定化剤又は請求項 8 ~ 11 のいずれかに記載の安定化剤組成物と、特異的結合対形成物質とを含む、特異的結合対形成物質を用いる測定のための組成物。 10

【請求項 21】

特異的結合対形成物質が、生体内物質の測定に使用するものである、請求項 20 記載の特異的結合対形成物質を用いる測定のための組成物。

【請求項 22】

特異的結合対形成物質が、抗体、抗原又は核酸である、請求項 20 記載の特異的結合対形成物質を用いる測定のための組成物。

【請求項 23】

請求項 12 ~ 19 のいずれかに記載のブロッキング剤と特異的結合対形成物質とを含む、特異的結合対形成物質を用いる測定のための組成物。 20

【請求項 24】

特異的結合対形成物質が、生体内物質の測定に使用するものである、請求項 23 記載の特異的結合対形成物質を用いる測定のための組成物。

【請求項 25】

特異的結合対形成物質が、抗体、抗原又は核酸である、請求項 23 記載の特異的結合対形成物質を用いる測定のための組成物。

【請求項 26】

抗体、抗原又は核酸が、免疫学的測定、核酸プローブ又は核酸チップに使用される標識物質との複合体又は固相に固着させた抗体、抗原又は核酸であることを特徴とする、請求項 25 記載の特異的結合対形成物質を用いる測定のための組成物。 30

【請求項 27】

乾燥状態又は溶液状態である、請求項 20 ~ 26 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 28】

特異的結合対形成物質に、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の安定化剤又は請求項 8 ~ 11 のいずれかに記載の安定化剤組成物を共存させることを特徴とする、特異的結合対形成物質の安定化方法。

【請求項 29】

特異的結合対形成物質を固着させた固相に、請求項 12 ~ 19 のいずれかに記載のブロッキング剤を被覆することにより、試料中の物質の該固相への非特異的結合を防止することからなる、非特異的結合の防止方法。 40

【請求項 30】

請求項 20 ~ 27 のいずれかに記載の組成物を含むことを特徴とする、特異的結合対形成物質を用いる測定のためのキット。

【請求項 31】

請求項 12 ~ 19 のいずれかに記載のブロッキング剤が固着された固相を含むことを特徴とする、特異的結合対形成物質を用いる測定のためのキット。

【請求項 32】

植物由来のポリペプチドの、特異的結合対形成物質測定試薬に対する安定化剤又はブロッキング剤としての使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、植物由来のポリペプチドを有効成分として含有する特異的結合対形成物質の保存のための安定化剤、前記植物由来のポリペプチドを含む特異的結合対形成物質を用いる測定における非特異的吸着のブロッキング剤に関する。更に本発明は、これらを含む組成物、キットに関する。

## 【背景技術】

10

## 【0002】

生体内に存在する特異的結合対形成物質である抗体、抗原などのタンパク質が有する機能は、その立体構造が関与していることが知られており、立体構造が変化することでその機能を失うことが知られている。特に抗原抗体反応においては、抗原に特異的に結合する抗体の可変領域や、補体結合領域（Fc領域）の立体構造が重要な働きをしているため、抗体の保存はかかる立体構造を破壊しないよう、細心の注意を要する。従って、現在は抗体の保存には、抗体とポリエチレングリコールや牛血清アルブミン（以下「BSA」とも記載する）とを混合し、凍結保存する手法等が用いられている。

## 【0003】

一方、抗体又は抗原の測定には、免疫学的測定法等の手法が一般的に使用されている。かかる方法ではプレート、ビーズ、ラテックス粒子などの固相担体に、抗体又は抗原を結合させるが、抗体又は抗原が結合しなかった固相の部位は、測定対象である抗体又は抗原などの非特異的な吸着を防ぐためにブロッキング剤により被覆される。この様なブロッキング剤としても、上述のBSAが広く用いられている。

20

また、核酸、蛋白質等の検体を支持担体上で検出する系において、支持担体に固定化された特異的結合物質を前記検体に結合させる際に、検体の支持体担体への非特異的吸着を防ぐ目的でカゼインを成分とするブロッキング剤が用いられている（特許文献1）

更に、DNAチップ（DNAマイクロアレイ）の製造において、ガラスや半導体等の固相表面に、DNAプローブと呼ばれる既知遺伝子配列のDNAを多数固定化させるが、前記固相のDNAプローブ非結合部分は、サンプル中に含まれる標的DNA等との非特異的な吸着を防ぐために

30

## 【0004】

一方、BSAを用いないタンパク質の安定化技術として小麦、大豆などのタンパク質の加水分解物を食品加工用酵素であるトランスグルタミナーゼの安定化剤として使用する技術が特許文献3には開示されている。しかし、抗体は酵素よりもよりその機能が失われやすい場合もあり、一般的に酵素に使用できる技術を即抗体に転用できるとは考えられない。また、一般に乾燥状態よりも溶液状態での保存の方が安定性に欠けると考えられており、乾燥状態の安定化効果が即溶液状態にも適用できるとは一般に考えられていないが、特許文献3には乾燥状態での安定化についてしか言及されていない。従って、特許文献3には

40

## 【0005】

【特許文献1】特開平6 - 160385号公報

【特許文献2】特開平11 - 187900号公報

【特許文献3】W096 / 11264

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

現在、特異的結合対形成物質の安定化剤や特異的結合対形成物質を用いる測定における

50

非特異的吸着のブロッキング剤として一般的に使用されているBSAはウシの血液由来のタンパク質である。一般に、動物の体液や分泌物に由来するタンパク質は、たとえ医薬としての使用ではなくとも人畜共通感染症（例えばウシについては牛海綿状脳症（BSE）、口蹄疫等が挙げられる）などへの配慮が必要である。また更に、抗体の機能は失われやすく、たとえBSAを添加したとしても、溶液状態で室温に放置すると、数日のうちに抗原結合性能が著しく低下する。従って、抗体の安定化作用や抗体、抗原、核酸等の特異的結合対形成物質を用いる測定に使用される物質の非特異的吸着を防止する作用が優れ、かつ、BSEなどの病原体の感染の恐れがない安定化剤の開発が望まれていた。

【課題を解決するための手段】

【0007】

10

これらの課題を解決するために、本発明者らは検討した結果、植物由来のポリペプチドが生体に由来する特異的対形成結合物質の安定性を著しく向上させることを見出し、これを安定化剤、特異的結合対形成物質を用いる測定における非特異的吸着のブロッキング剤として使用することで本発明を完成させた。

【0008】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) 植物由来のポリペプチドを有効成分として含有する、特異的結合対形成物質の安定化剤。

(2) 特異的結合対形成物質が、生体内物質の測定に使用するものである、(1)記載の安定化剤。

20

(3) 特異的結合対形成物質が、抗体、抗原又は核酸である、(1)記載の安定化剤。

(4) 「植物由来のポリペプチド」が、「植物由来のタンパク質」を分解して得られるポリペプチドであることを特徴とする、(1)～(3)のいずれかに記載の安定化剤。

(5) 「植物」が、「農作物」であることを特徴とする、(1)～(4)のいずれかに記載の安定化剤。

(6) 「植物」が、大豆、小豆、インゲン豆、ソラ豆、アーモンド、ピーナッツ、小麦、トウモロコシ、ジャガイモ及び米から選択される何れかの植物であることを特徴とする、(1)～(5)のいずれかに記載の安定化剤。

(7) タンパク質が、グリアジン、ツェイン、グルテニン、グルテン、ホルデイン、オリゼニン、グリシニン、パタチン及びコングリシニンからなる群から選択される一以上のタンパク質であることを特徴とする、(4)記載の安定化剤。

30

(8) (1)～(7)のいずれかに記載の安定化剤と、アルカリ又は緩衝液とを含む、安定化剤組成物。

(9) 無菌濾過された溶液であって、pH3.0～9.0であることを特徴とする、(8)記載の安定化剤組成物。

(10) 免疫学的測定用である、(8)又は(9)に記載の安定化剤組成物。

(11) 核酸プローブ用又は核酸チップである、(8)又は(9)に記載の安定化剤組成物。

(12) 植物由来のポリペプチドを有効成分として含有する、特異的結合対形成物質を用いる測定における非特異的吸着のブロッキング剤。

40

(13) 「植物由来のポリペプチド」が、「植物由来のタンパク質」を分解して得られるポリペプチドであることを特徴とする、(12)記載のブロッキング剤。

(14) 植物が、「農作物」であることを特徴とする、(12)又は(13)記載の記載のブロッキング剤。

(15) 「植物」が、大豆、小豆、インゲン豆、ソラ豆、アーモンド、ピーナッツ、小麦、トウモロコシ、ジャガイモ及び米から選択される何れかの植物であることを特徴とする、(12)～(14)のいずれかに記載のブロッキング剤。

(16) タンパク質が、グリアジン、ツェイン、グルテニン、グルテン、ホルデイン、オリゼニン、グリシニン、パタチン及びコングリシニンからなる群から選択される一以上のタンパク質であることを特徴とする、(13)記載のブロッキング剤。

50

(17) 特異的結合対形成物質の安定化効果を有する、(12)～(16)のいずれかに記載のブロッキング剤。

(18) 特異的結合対形成物質が、生体内物質の測定に使用するものである、(17)記載のブロッキング剤。

(19) 特異的結合対形成物質が、抗体、抗原又は核酸である、(17)記載のブロッキング剤。

(20) (1)～(7)のいずれかに記載の安定化剤又は(8)～(11)のいずれかに記載の安定化剤組成物と、特異的結合対形成物質とを含む、特異的結合対形成物質を用いる測定のための組成物。

(21) 特異的結合対形成物質が、生体内物質の測定に使用するものである、(20)記載の特異的結合対形成物質を用いる測定のための組成物。 10

(22) 特異的結合対形成物質が、抗体、抗原又は核酸である、(20)記載の特異的結合対形成物質を用いる測定のための組成物。

(23) (12)～(19)のいずれかに記載のブロッキング剤と特異的結合対形成物質とを含む、特異的結合対形成物質を用いる測定のための組成物。

(24) 特異的結合対形成物質が、生体内物質の測定に使用するものである、(23)記載の特異的結合対形成物質を用いる測定のための組成物。

(25) 特異的結合対形成物質が、抗体、抗原又は核酸である、(23)記載の特異的結合対形成物質を用いる測定のための組成物。

(26) 抗体、抗原又は核酸が、免疫学的測定、核酸プローブ又は核酸チップに使用される標識物質との複合体又は固相に固着させた抗体、抗原又は核酸であることを特徴とする、(25)記載の特異的結合対形成物質を用いる測定のための組成物。 20

(27) 乾燥状態又は溶液状態である、(20)～(26)のいずれかに記載の組成物。

(28) 特異的結合対形成物質に、(1)～(7)のいずれかに記載の安定化剤又は(8)～(11)のいずれかに記載の安定化剤組成物を共存させることを特徴とする、特異的結合対形成物質の安定化方法。

(29) 特異的結合対形成物質を固着させた固相に、(12)～(19)のいずれかに記載のブロッキング剤を被覆することにより、試料中の物質の該固相への非特異的結合を防止することからなる、非特異的結合の防止方法。 30

(30) (20)～(27)のいずれかに記載の組成物を含むことを特徴とする、特異的結合対形成物質を用いる測定のためのキット。

(31) (12)～(19)のいずれかに記載のブロッキング剤が固着された固相を含むことを特徴とする、特異的結合対形成物質を用いる測定のためのキット。

(32) 植物由来のポリペプチドの、特異的結合対形成物質測定試薬に対する安定化剤又はブロッキング剤としての使用。

#### 【発明の効果】

#### 【0009】

本発明により、特異的結合対形成物質の安定化剤、特異的結合対形成物質を用いる測定における非特異的吸着のブロッキング剤、特異的結合対形成物質と前記安定化剤又は前記ブロッキング剤とを含む特異的結合対形成物質を用いる測定のための組成物、及び安定化剤又は非特異的吸着のブロッキング剤を含む特異的結合対形成物質を用いる測定のためのキットが提供される。本発明の安定化剤及び非特異的吸着のブロッキング剤は、公知の安定化剤であるBSAと比べて特異的結合対形成物質の優れた安定化作用、非特異的吸着のブロッキング作用を有するだけでなく、病原体による汚染の恐れがない。 40

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0010】

以下、発明を実施するための最良の形態により詳説する。

#### (1) 本発明安定化剤

本発明安定化剤は、植物由来のポリペプチドを有効成分として含有する生体物質等の測 50

定に使用される特異的結合対形成物質の安定化剤である。

【0011】

本発明安定化剤が安定化する対象は特異的結合対形成物質である。ここで「特異的結合対形成物質」とは、生体物質の示す特異的相互作用（親和性）に基づいて結合対を形成する対物質の一方を意味し、具体的には、抗体と抗原、ビオチンとアビジン又はストレプトアビジン、特定の糖とそれに対応するレクチン、サイトカイン、ケモカイン等の生理活性物質とそれに対するレセプター（受容体）、ヒアルロン酸とヒアルロン酸結合物質、エンドトキシンとエンドトキシン中和タンパク質、 $\alpha$ -グルカンと $\beta$ -グルカン結合タンパク質、特定の配列を有する核酸とそれに相補的またはストリンジェントな条件でハイブリダイズする核酸等の組合せ（対）の一方の物質が挙げられ、その由来、種類、存在形態は特に限定はされないが、好ましくは生体内物質の測定に使用される物質である。また、抗原としては、免疫学的測定に用いられる抗原が好ましく、例えば、タンパク質、糖質、脂質、核酸、細菌抗原、ウイルス抗原、癌抗原、免疫グロブリン等が挙げられる。また、核酸としては、核酸プローブ、核酸チップに使用されるものであれば特に限定されず、その限りにおいて、デオキシリボヌクレオチド（DNA）又はリボヌクレオチド（RNA）の種々の分子量のもの（オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド）や、核酸塩基に糖以外の分子が付加したもの（例えば、ペプチド核酸（PNA）、その他誘導体）も包含される。

10

【0012】

本発明において「特異的結合対形成物質の安定化」とは、特異的結合対形成物質の保存、乾燥、熱に対する安定化を意味し、より具体的には特異的結合対形成物質である抗体、抗原、ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体（より具体的には核酸）を長期保存、乾燥、凍結する際に、これらの物質の特異的結合部位の破壊や力価低下を防止する機能を有する。

20

【0013】

本発明安定化剤における「植物」とは、「農作物」であり、例えば小麦、大麦、カラス麦、トウモロコシ、ジャポニカ米、インディカ米、ジャバニカ米、アフリカ米、餅米、大豆、小豆、インゲン豆、そら豆、アーモンド、ピーナッツ、ジャガイモ、サツマイモ、サトイモ、タロイモ等が好ましくは挙げられ、その中でも大豆、小麦（コムギ）、トウモロコシ、ジャガイモ及び米がより好ましく、大豆（ダイズ）及びトウモロコシが最も好ましい。

30

【0014】

本発明安定化剤における「植物由来のポリペプチド」としては、例えば上記植物由来のタンパク質を分解して得られうるポリペプチドが好ましい。ここで、上記植物由来のタンパク質としては、上記植物から抽出されたタンパク質又はタンパク質を含む画分が挙げられ、より具体的にはグリアジン、ツェイン、グルテニン、グルテン、ホルデイン、オリゼニン、グリシニン、パタチン及びコングリシニン等の貯蔵タンパク質、レクチン、アミラゼ、呼吸及び光合成に関与する酵素等の機能タンパク質、根、茎、葉、花、果実、種子などに由来する構造タンパク質が挙げられる。それらの中でも特に貯蔵タンパク質が好ましくは挙げられる。また、上述のタンパク質からポリペプチドを得るには、該タンパク質を分解すれば良く、「分解」の手法としては、酵素分解、酸分解、アルカリ分解等が挙げられるが、低分子化してポリペプチドを得るという目的を達成できる限りにおいて、これらに限定されるものではない。分解は特に加水分解が好ましい。加水分解に使用出来る酵素は、プロテアーゼに属するもので、タンパク質をポリペプチドに分解できるものあれば良く、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン等の動物由来のプロテイナーゼ、パパイン、フィシン、プロメライン等の植物由来のプロテアーゼ、その他、細菌、カビ、放射菌等の微生物由来のプロテアーゼ等が挙げられる。また、酸分解の場合、塩酸、硫酸、リン酸、硝酸等の酸が挙げられ、アルカリ分解の場合は、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム等が挙げられる。分解された後の「ポリペプチド」は、重量平均分子量200Da~30万Daであることが好ましく、重量平均分子量300Da~20万Daであることがより好ましい。また、タンパク質を加水分解するとアミノ酸が生ずるが、本発明安定化剤において

40

50

は、「ポリペプチド」が構成成分として含まれている限りにおいて、「アミノ酸」が混入していても構わない。さらに、2種以上の植物または同一植物の2種以上のタンパク質に由来するポリペプチドを併用しても良い。またさらに、本発明安定化剤と、他の安定化剤（糖類、界面活性剤など）を併用しても良い。

また、好ましい植物由来ポリペプチドとしては、ダイズタンパク加水分解物、コムギタンパク加水分解物およびその誘導体、ジャガイモタンパク加水分解物、トウモロコシタンパク加水分解物、コメヌカタンパク加水分解物などが挙げられ、その中でもトウモロコシ加水分解物が好ましい。トウモロコシ加水分解物としては、例えば、分子量200 Da～4000 Daのペプチドで、遊離アミノ酸含量が全アミノ酸に対して1%以下であるものが好ましい。また、その中でも、アミノ酸組成（重量%）が、アスパラギン酸2.5～12.5、スレオニン2.5～6.0、セリン4.0～6.0、グルタミン酸15.0～50.0、グリシン2.0～5.5、アラニン2.0～13.5、バリン4.0～8.0、システイン0.0～1.5、メチオニン1.0～2.0、イソロイシン3.0～6.0、ロイシン6.0～15.0、チロシン1.0～4.0、フェニルアラニン2.0～5.5、リジン0.5～7.0、ヒスチジン0.5～3.0、アルギニン1.0～8.0、プロリン5.0～13.0であるものがより好ましい。

各分解物の主な性状の一例は下記の通りである。

1) ダイズタンパク加水分解物

外観：淡黄色～褐色

総窒素分（%）：2.6～3.4

pH：3.8～6.2

2) ダイズタンパクペプトン

3) ダイズタンパク酵素分解物

4) ダイズタンパク酸分解物

コムギタンパク加水分解物

外観：褐色液体

乾燥減量（%）：75～80

総窒素量（%）：2.7～3.5

6) コムギタンパク加水分解物誘導体

外観：灰色がかった白色

総固形分（%）：81.3～100

窒素（%）：13.0～16.0

強熱残分（%）：13.5以下

pH：3.5～4.5

水分（%）：5.0以下

7) ジャガイモタンパク加水分解物

外観：黄色

総固形分（%）：24.0～28.0

窒素（%）：2.5～4.0

強熱残分（%）：4.5以下

pH：4.0～5.0

分子量：600

8) トウモロコシタンパク加水分解物

外観：白色または微黄色

水分（%）：5.0以下

粗灰分（%）：2.0以下

粗蛋白（%）：90.0以上

糖分（%）：5.0以下

重金属（ppm）：4.0以下

ヒ素（ppm）：1.0以下

分子量分布：2～10程度のオリゴペプチド

10

20

30

40

50

アミノ酸組成(重量%)：グルタミン酸24.67、ロイシン13.69、アラニン12.99、プロリン9.69、アスパラギン酸6.04、セリン5.33、バリン4.94、スレオニン3.95、イソロイシン3.77、チロシン3.42、グリシン2.39、フェニルアラニン2.00、メチオニン1.45、アルギニン1.21、システイン1.07、リジン1.00、ヒスチジン1.00

9) コメヌカタンパク質加水分解物

pH：6.5～7.5

分子量：150,000

本発明安定化剤は、抗体、抗原又は核酸と、免疫学的測定、核酸プローブ又は核酸チップに使用される標識物質との複合体又は固相化抗体、抗原もしくは核酸も安定化させることができる。上記標識物質としては、酵素、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、ラジオアイソトープ、蛍光物質、発光物質、金属コロイドなどが挙げられる。

【0015】

本発明安定化剤組成物は、上記安定化剤とアルカリ又は緩衝剤とを含む。特に、溶液状態であることが好ましいが、乾燥状態であってもよい。

【0016】

すなわち、本発明安定化剤はアルカリを含む水性溶媒に溶解して溶液状の安定化剤として使用することが可能である。アルカリとしては、アルカリ金属水酸化物、アルカリ土類水酸化物が挙げられ、特に、アルカリ金属水酸化物が好ましい。アルカリ金属水酸化物は、カリウム、リチウム、ナトリウム等のアルカリ金属の水酸化物であり、具体的には水酸化カリウム、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム等である。又、これらは単独あるいは複数のアルカリ金属水酸化物を含む水溶液として使用することもできる。その中でも最も好ましいのは水酸化ナトリウムである。アルカリ、特に、アルカリ金属水酸化物の濃度は、通常、5mmol/l～2mol/l、好ましくは10mmol/l～500mmol/lである。前記水溶液のpHは、通常pH3.0～9.0であり、好ましくは、pH6.5～8.0、更に好ましくは、pH6.8～7.2である。

【0017】

又、本発明安定化剤は緩衝剤(緩衝剤溶液)に溶解して使用することも可能である。緩衝剤の種類としては、リン酸緩衝剤、トリス塩酸緩衝剤、グッド緩衝剤、ホウ酸緩衝剤等が望ましいが、これらに限定されるものではない。これらは単独あるいは混合物として使用され、任意の量を用いることができる。

更に、アルカリ金属水酸化物又は緩衝剤に溶解してpHを調整した後、0.22 $\mu$ mフィルター等を用いて無菌濾過した液を本発明の安定化剤組成物として用いることもできる。

【0018】

本発明安定化剤又は安定化剤組成物のポリペプチドの濃度は、通常0.01～40%(w/v)、好ましくは0.1～30%(w/v)である。

また、本発明安定化剤又は安定化剤組成物は、特異的結合対形成物質、特に、抗体又は抗原を安定化させてその力価を高く保つ働きを有しており、抗体又は抗原を保存しておく際に、ポリペプチドが0.01～10%(w/v)となるように本発明安定化剤又は安定化剤組成物を添加して組成物としておき、この溶液状の組成物の状態或いはそれを乾燥させた状態の組成物として、抗体又は抗原を安定に保存することが可能である。なお、実際に使用する際には、例えば、抗体を1ng/ml～10mg/ml含む溶液(例えばリン酸緩衝生理的食塩水(PBS)などの溶液)に本発明安定化剤又は安定化剤組成物を添加して使用することができる。

また、かかる組成物には、本発明安定化剤又は安定化剤組成物及び特異的結合対形成物質の他に、例えばその他の安定化剤、防腐剤、界面活性剤、糖類、多価アルコール(グリセロールなど)、水酸基を有するポリエーテル(ポリエチレングリコール(PEG)など)などを含んでいても良い。

【0019】

前記界面活性剤としては非イオン界面活性剤、好ましくはポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル(トウィーン系界面活性剤)およびポリオキシエチレンp-t-オクチルフェニルエーテル(トリトン系界面活性剤)が挙げられ、最も典型的にはTween20およびTri

10

20

30

40

50

tonX-100が例示される。なお、かかる界面活性剤を特異的結合対形成物質同士の反応（例えば、抗原抗体反応、相補的核酸同士の反応など）の反応液に存在させると、ブランク値を低下させる効果を示す。さらに、固相に結合した特異的結合対の一方の物質と遊離の他方の物質による反応の前あるいは後の固液分離（洗浄等）を行なう際に、かかる界面活性剤を存在させることによってブランク値を低下させることができる。

#### 【0020】

前記糖類としては、単糖、二糖（スクロース、マルトース、ラクトース、トレハロースなど）、糖アルコール（ソルビトールなど）、オリゴ糖（ラフィノース、マルトトリオースなど）、水溶性多糖類（環状デキストリン、水溶性セルロース、プルラン、カラゲナンなど）が例示される。

10

このような組成物は、例えば、抗体を使用するキット（例えば免疫学的測定用のキット）や核酸プローブを使用するキットの構成要素として加えることができ、キットの品質保持期限を大幅に延ばすことが可能となるため極めて有用である。

#### 【0021】

かかる本発明安定化剤は、後述の本発明ブロッキング剤としても使用することが可能であり、かかる使用を行うと、特異的結合対形成物質を安定化させる働きを奏する非特異的吸着のブロッキング剤とすることができ、極めて有用である。

#### （2）本発明ブロッキング剤

本発明ブロッキング剤は、植物由来のポリペプチドを有効成分とする、特異的結合対形成物質を用いる測定における非特異的吸着のブロッキング剤である。ここで「ブロッキング剤」とは、特異的結合対形成物質を固着させた固相（又は担体）に対し、特異的結合対形成物質を用いて測定されるべき物質が非特異的に結合して、目的物質の測定が正確に行えなくなることを防ぐ作用を有する物質を意味する。

20

#### 【0022】

本発明ブロッキング剤における、「植物」、「植物由来のポリペプチド」、「分解」は、上記本発明安定化剤と同様である。

#### 【0023】

本発明ブロッキング剤は、特異的結合対形成物質を用いる測定において、固相（又は担体）に特異的結合対形成物質（特異的結合タンパク質、抗体、抗原又は核酸など、特に抗体が好ましい）を固着させた後、検体中の特異的結合物質と複合体を形成する物質が固相に対して非特異的に結合するのを防止するために固相に固着させて使用される。このような固相の形態としては、例えばプレート、ビーズ、ラテックス粒子、膜等が例示され、その中でも特にプレートが好ましい。また、固相の材質としては、ポリスチレン、ニトロセルロース、セルロースアセテート、シリカゲル、ガラス、金属、半導体、シリコン、磁性担体、セラミック、紙、布などが挙げられ、その中でもポリスチレンが好ましい。本発明ブロッキング剤を固相へ固着又は被覆する方法は、物理的吸着方法や化学的吸着方法などがあり、いずれにも限定はされないが、通常用いられている物理的吸着方法で行うことが好ましい。

30

また、本発明のブロッキング剤と特異的結合対形成物質とを含む特異的結合対形成物質を用いる測定のための組成物としては、例えば、特異的結合対形成物質、特に、抗体、抗原又は核酸が固着された固相の該特異的結合対形成物質が結合していない部分に、本発明のブロッキング剤を固着又は被覆させて、該特異的結合対形成物質が該部分に非特異的に結合することを防止できるようにしたものが挙げられる。

40

更に、上記組成物としては、例えば、本発明のブロッキング剤と、前記抗体、抗原又は核酸に免疫学的測定、核酸プローブ又は核酸チップに使用される標識物質が結合した複合体とを含む組成物であってもよい。

#### 【0024】

本発明ブロッキング剤を、例えばプレートに固着させる場合には、以下の方法に従って行うことができる。すなわち、抗体などを固着させたプレートを、例えば、PBSなどで数回程度洗浄し、その後、0.1～10% (w/v) で本発明ブロッキング剤を含むPBSなどをプレート

50

に分注した後、10分～24時間、2～40 条件下でインキュベートする。そして、インキュベート後に溶液を除去し、数回PBS ( Tween20等の非イオン性界面活性剤を含んでいてもよい ) 等で洗浄する。かかる操作により本発明ブロッキング剤が固着したプレートを調製することが可能である。かかる抗体などを固着させたプレートは、本発明ブロッキング剤でインキュベートし、溶液を捨てた後、そのまま乾燥させて抗体と特異的に結合する抗原等の測定用のキットの構成要素としてキットに加えることが可能であり、固相への非特異的結合を防止できるだけでなく、抗体の品質保持期限を大幅に延ばすことが可能となるため極めて有用である。この様なキットには、更に上述の本発明安定化剤を構成要素として加えることも可能である。

#### 【実施例1】

10

#### 【0025】

本発明安定化剤の酵素標識抗体に対する安定化作用の検討

#### 1) 方法

#### (1) 酵素標識抗体溶液の調製及び保存

表1に記載の試験物質 ( 安定化剤 ) を0.15mol/l塩化ナトリウム、0.05%Tween20及び防腐剤として0.05%プロクリン300を含む50mmol/l トリス塩酸緩衝液 ( Tris-HCl : pH7.3～7.7 ) ( 以下、T-TBSと記載する ) で、所定の濃度に調整した後、0.22 $\mu$ mフィルターで濾過した溶液を試験物質溶液とした。西洋ワサビペルオキシダーゼ ( HRP ) 標識ヤギ抗マウスIgG抗体 ( 以下、HRP-抗マウスIgG抗体と記載 ) ( Jackson社製 ) を上記試験物質溶液で10000倍希釈した溶液を試験に用いた。調製当日 ( day0 )、37 $^{\circ}$ Cで保存した5日目 ( day5 ) 及び12日

20

#### (2) 酵素標識抗体の活性測定方法

#### (i) 固相化ヤギ抗マウスIgG抗体プレートの作成

ヤギ抗マウスIgG抗体 ( Jackson社製 ) をリン酸緩衝生理食塩水 [ pH7.2～7.5、カルシウムイオン等の2価イオン不含 : 以下、PBS(-)と記載する ] で、20 $\mu$ g/mLに希釈し、この溶液50 $\mu$ Lずつをヌンクイムノプレート ( 商品名 : マキシソープ、ヌンク社製 ) の各ウェルに加え、4 $^{\circ}$ Cで14～18時間保存することにより、均一にコーティングした。このプレートをPBS(-)で2回洗浄し、ウェルのヤギ抗マウスIgG抗体でコーティングされていない部分をブロッキングするためのブロッキング物質として、2%ウシ血清アルブミン ( BSA ) ( 生

30

#### (ii) 酵素標識抗体の活性測定方法

上記洗浄後、上記(i)において作成した固相化ヤギ抗マウスIgG抗体プレートの各ウェルに、1%BSAを含むT-TBS ( 以下、反応液と記載する ) を100 $\mu$ Lずつ加え、続いて、所定の各ウェルに反応液で100ng/mLに調製したマウスIgGを20 $\mu$ Lあるいはブランクとして反応液のみを20 $\mu$ L加え、37 $^{\circ}$ Cで60分間静置して抗原抗体反応を行った。

#### 【0026】

この反応終了後、T-TBSで各ウェルを4回洗浄した後、上記(1)で調製した試験物質 ( 安定化剤 ) を含む各HRP-抗マウスIgG抗体溶液を各ウェルに100 $\mu$ L加え、これを37 $^{\circ}$ Cで60分間静置して反応させた。

40

#### 【0027】

反応終了後、このプレートをT-TBSで4回洗浄し、ペルオキシダーゼの基質としてテトラメチルベンジジン ( TMB ) 溶液 ( モス社製 ) を100 $\mu$ L加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させ、発色させた。プレートに1N-HClを100 $\mu$ L加えて反応を停止させ、TMBの分解による着色液の波長450nmの吸光度 ( 対照波長630nm ) をウェルリーダー ( 商標名 ) SK-603 ( 生化学工業株式会社販売 ) で測定した。

#### 【0028】

HRP-抗マウスIgGの反応性は、マウスIgG 100ng/mLにおける吸光度からブランクにおけ

50

る吸光度を減算した吸光度差（以下、吸光度差と記載する）で評価した。HRP-抗マウスIgGの安定性は、各試験物質ともに、試験溶液調製当日（day0）における吸光度差に対する各試験日における吸光度差の百分率（残存活性、%）で示した。対照品であるBSAでの残存活性の-10%を許容範囲とし、それ以上の残存活性を有する物質をBSAと同等以上の安定化効果ありと評価した。結果を表1に示した。なお、BSAは生化学工業株式会社販売、ゼラチン、脱脂粉乳はナカライテスク社販売、カゼインは和光純薬工業株式会社販売を使用し、ダイズ（大豆）タンパク質分解物、コムギ（小麦）タンパク質分解物、ジャガイモタンパク質分解物及びトウモロコシタンパク質分解物は、それぞれ、前記の2）ダイズタンパク質ペプトン、3）ダイズタンパク質酵素分解物、4）ダイズタンパク質酸分解物、5）コムギタンパク質加水分解物、6）コムギタンパク質加水分解物誘導体、7）ジャガイモタンパク質加水分解物、8）トウモロコシタンパク質加水分解物を使用した。

10

【0029】

## 2) 結果

37、12日間保存において、HRP-抗マウスIgG抗体の残存活性は、無添加では4%、BSA添加では68%であった。BSA以外によく使用される動物性タンパクについては、カゼインが69%と良好であったが、ゼラチンは14%、脱脂粉乳は17%と不良であった。

【0030】

一方、本発明の植物性由来物質（ポリペプチド）では、いずれの物質においても、残存活性が60%以上と良好な安定化効果を示した。特に、トウモロコシタンパク質加水分解物では86%、ダイズタンパク質加水分解物では90%以上と非常に良好な安定化効果を示した。

20

【0031】

これらの結果から、植物由来のタンパク質の分解物は、動物性タンパク質より優れた抗体の安定化効果があることが示された。

【0032】

【表1】

	試験物質	試験濃度	残存活性(%)			評価	
			day0	day5	day12		
対照	BSA	1%	100	73	68	○	
	ゼラチン	0.1%	100	40	14	×	
	カゼイン	0.1%	100	83	69	○	
	脱脂粉乳	0.1%	100	51	17	×	
	無添加	-	100	24	4	×	
実験群	ダイズタンパク質	ペプトン	1%	100	99	95	◎
		酵素分解物	1%	100	101	90	◎
		酸分解物	1%	100	88	69	○
	コムギタンパク質 (誘導体)	加水分解物	1%	100	78	74	◎
		加水分解物誘導体	1%	100	80	62	○
	ジャガイモタンパク質	加水分解物	1%	100	91	78	◎
	トウモロコシタンパク質	加水分解物	1%	100	-	86	◎

30

40

【0033】

注：12日後の残存活性が0～30%を×、30～50%を○、50～70%を◎、それ以上を◎とした。

【実施例2】

【0034】

本発明ブロッキング剤の固相化抗体に対する安定化作用の検討

## 1) 方法

## (1) ブロッキング溶液の調製

表2に記載の試験物質（ブロッキング剤）を防腐剤として0.05%のプロクリン300を含むリン酸緩衝液〔実施例1でのPBS(-)のうち、塩化ナトリウムを含まないリン酸緩衝液。以

50

下、PB(-)と記載する)で、各試験濃度に調製し、0.22 $\mu$ mのフィルターで濾過した溶液をブロッキング溶液とした。各試験ブロッキング溶液は、冷蔵(2~8 )で使用時まで保存し、使用前に常温に戻して使用した。

#### 【0035】

##### (2) 固相化ヤギ抗マウスIgG抗体プレートの作成及び保存

ヤギ抗マウスIgG抗体あるいは正常ヤギIgG(Jackson社製)を、上記実施例1と同様にプレートへコーティングした。固相化正常ヤギIgGプレートを陰性コントロールプレートとして使用した。同様にPBS(-)での洗浄後、各ウェルの抗体でコーティングされていない部分をブロッキングするためのブロッキング物質として、上記(1)で調製したブロッキング溶液を用いた。各ブロッキング溶液を添加し、室温で2時間静置後、溶液を除去し、37 で2時間乾燥させ、所望する各固相化抗体プレートを得た。

#### 【0036】

このように、作成した固相化抗体プレートをアルミジップ袋に封入し、作成時(day0)、55 で保存した4日目(day4)と7日目(day7)に安定性を検討した。各固相化抗体プレートは、使用前に常温に戻した後、測定に使用した。

#### 【0037】

##### (3) 固相化抗体の活性測定方法

各ブロッキング溶液の安定化効果を評価するため、固相化抗体に結合し得るHRP標識マウスIgG量(活性)を以下のように測定した。

上記(2)で作成した固相化抗体プレートを室温に戻した後、T-TBSで4回洗浄した。続いて、各ウェルに200000倍に希釈したHRP標識マウスIgG(Jackson社製)を含む反応液を100 $\mu$ Lずつ加え、37 で60分間静置して抗原抗体反応を行った。

#### 【0038】

この反応終了後、このプレートをT-TBSで4回洗浄し、上記実施例1と同様にペルオキシダーゼの基質としてTMB溶液(モス社製)を100 $\mu$ L加え、37 で30分間反応させ、発色させた。プレートに1mol/l HClを100 $\mu$ L加えて反応を停止させ、TMBの分解による着色液の波長450nmの吸光度(対照波長630nm)をウェルリーダー(商標名)SK-603(生化学工業株式会社販売)で測定した。

#### 【0039】

固相化ヤギ抗マウスIgG抗体の反応性(結合するHRP標識マウスIgG量)は、各ブロッキング溶液とともに、固相化ヤギ抗マウスIgG抗体ウェルにおける吸光度から固相化正常ヤギIgGウェルにおける吸光度を減算した吸光度差(以下、吸光度差と記載する)で評価した。

固相化ヤギ抗マウスIgG抗体の安定性は、各ブロッキング溶液とともに、固相化抗体プレート作成当日(day0)における吸光度差に対する各試験日における吸光度差の百分率(残存活性、%)で示し、残存活性が70%以上を良好と評価した。結果を表2に示した。

なお、BSAは生化学工業株式会社販売、ゼラチン、脱脂粉乳はナカライテスク社販売、カゼインは和光純薬工業株式会社販売を使用し、ダイズ(大豆)タンパク質分解物、コムギ(小麦)タンパク質分解物、ジャガイモタンパク質分解物、トウモロコシタンパク質分解物及びコメヌカタンパク質は、それぞれ、前記の2)ダイズタンパク質ペプトン、3)ダイズタンパク質酵素分解物、4)ダイズタンパク質酸分解物、5)コムギタンパク質加水分解物、6)コムギタンパク質加水分解物誘導体、7)ジャガイモタンパク質加水分解物、8)トウモロコシタンパク質加水分解物、9)コメヌカタンパク質加水分解物を使用した。

#### 【0040】

##### 2) 結果

55、7日間における残存活性は、BSAでのブロッキングでは7%と著しく低下した。その他、ブロッキング剤としてよく使用される動物性タンパク質として、ゼラチンは27%、カゼインは40%、脱脂粉乳は50%といずれも残存活性はBSAでのブロッキングに比べ高い値を示したが、十分な安定化効果とは言えなかった。

#### 【0041】

一方、植物由来のタンパク質の分解物でのブロッキングでは、いずれも残存活性は70%以上であり、非常に良好な固相化抗体の安定化効果を示した。

【0042】

植物由来のタンパク質の分解物は、動物由来のタンパク質（又はその分解物）よりも、固相に固着された抗体に対して格段に優れた安定化効果を有するブロッキング剤として有用である結果が得られた。

【0043】

【表2】

	試験物質	試験濃度	残存活性(%)			評価	
			Day0	day4	day7		
対照	BSA	2%	100	12	7	×	
	ゼラチン	0.1%	100	19	27	×	
	カゼイン	1%	100	59	40	△	
	脱脂粉乳	1%	100	58	50	△	
実験群	ダイズタンパク質	ペプトン	3%	100	95	96	◎
		酵素分解物	3%	100	103	95	◎
		酸分解物	1%	100	100	97	◎
	コムギタンパク質 (誘導体)	加水分解物	3%	100	100	92	◎
		加水分解物誘導体	3%	100	99	96	◎
	ジャガイモタンパク質	加水分解物	3%	100	96	91	◎
	トウモロコシタンパク質	加水分解物	3%	100	100	99	◎
	コメヌカタンパク質	加水分解物	3%	100	85	70	○

10

20

【0044】

注：7日後の残存活性が0～30%を×、30～50%を△、50～70%を○、70%よりも大きい場合を◎とした。

【実施例3】

【0045】

本発明ブロッキング剤の混合使用あるいは他の添加剤との併用による抗体の安定化作用の検討

1) 方法

(1) ブロッキング溶液の調製

表3に記載の試験物質（ブロッキング剤）を用い、実施例2と同様にブロッキング溶液を調製した。

【0046】

なお、BSA、トウモロコシタンパク質（加水分解物）、コメヌカタンパク質（加水分解物）およびコムギタンパク質（加水分解物誘導体）（これらを以下の表では基剤と記載する。）は、全て実施例2と同一のものを使用した。また、他のブロッキング剤（安定化剤）であるプルランは生化学工業株式会社販売、スクロース、マルトース、ソルビトール、ラクトース、トレハロース、ラフィノース、グリセロール、ポリエチレングリコール（分子量300、PEG300）は和光純薬工業株式会社販売、マルトオリゴ糖（フジオリゴ#360（商品名））、イソマルトオリゴ糖（パノリッチ（商品名））、ニゲロオリゴ糖（ティストオリゴ（商品名））、α-グルコオリゴ（ゲントース（商品名））、高度分岐環状デキストリン（HBCD）、水溶性セルロースは日本食品化工株式会社製、カラゲナンはSigma社販売を用いた。

30

40

(2) 固相化ヤギ抗マウスIgG抗体プレートの作成及び保存

上記(1)で調製したブロッキング溶液を用い、実施例1と同様に固相化ヤギ抗マウスIgG抗体プレートを作成した。

【0047】

作成した固相化抗体プレートをアルミジップ袋に封入し、作成時（day0）に対して、55℃で保存した7日目（day7）における安定性を検討した。各固相化抗体プレートは、使用前に常温に戻した後、測定に使用した。

50

### (3) 固相化抗体の活性測定方法

各ブロッキング溶液による抗体の安定化効果を評価するため、固相化抗体に結合し得るマウスIgG量を以下のように測定した。

#### 【0048】

上記(2)で作成した固相化抗体プレートの各ウェルに、1%BSAを含むT-TBS(以下、反応液と記載する)を100 $\mu$ Lずつ加え、続いて、所定の各ウェルに反応液で150ng/mLに調製したマウスIgGを20 $\mu$ Lあるいはブランクとして反応液のみを20 $\mu$ L加え、4で60分間静置して抗原抗体反応を行った。

#### 【0049】

この反応終了後、洗浄液(T-TBS)で各ウェルを4回洗浄した後、反応液で5000倍に調製したHRP標識ヤギ抗マウスIgG抗体溶液を各ウェルに100 $\mu$ L加え、これを室温(15~25)で60分間静置して反応させた。

10

#### 【0050】

反応終了後、反応を室温(15~25)で30分間行なった以外は実施例1と同様に操作し、TMBの分解による着色液の吸光度測定した。

#### 【0051】

固相化ヤギ抗マウスIgG抗体の反応性は、マウスIgG 150ng/mLにおける吸光度値からブランク値を減算して求めた。固相化抗体プレート作成当日(day0)における反応性に対するday7の吸光度差の百分率(残存活性、%)で示し、その結果を表3に示した。

20

### 2) 結果

55、7日間(day7)における残存活性は、BSAでのブロッキングでは6%と著しく低下した。トウモロコシタンパク質単独では残存活性は117%と高い安定化効果が得られた。トウモロコシタンパク質にコメヌカタンパク質あるいはコムギタンパク質を加えた場合の残存活性はそれぞれ99%、97%と良好な安定化効果を維持した。

#### 【0052】

また、その他の添加剤として、各種糖類、グリセロール、PEGを添加剤として加えた場合にも、残存活性は84~119%と非常に良好な安定化効果を維持した。

#### 【0053】

このように、本発明の植物性タンパク質の分解物は、単独使用及び混合使用でも、さらに他の添加剤を併用した場合にも良好な安定化効果を維持することができる。

30

#### 【0054】

【表 3】

試験物質 (ブロッキング剤)			添加剤 濃度	残存活性 (%)		評価	
基剤	基剤 濃度	添加剤		day0	day7		
BSA	2%	なし	—	100	6	×	
トウモロコシタンパク質	2%	なし	—	100	117	◎	
トウモロコシタンパク質	2%	+	コメヌカタンパク質	0.1%	100	99	◎
			コムギタンパク質	0.1%	100	97	◎
			スクロース	1%	100	101	◎
			マルトース	1%	100	108	◎
			ソルビトール	1%	100	107	◎
			ラクトース	1%	100	110	◎
			トレハロース	1%	100	106	◎
			ラフィノース	1%	100	92	◎
			マルトオリゴ糖	1%	100	104	◎
			イソマルトオリゴ糖	0.1%	100	119	◎
			ニゲロオリゴ糖	1%	100	119	◎
			β-グルコオリゴ糖	1%	100	119	◎
			HBCD	1%	100	92	◎
			水溶性セルロース	0.1%	100	84	◎
			プルラン	1%	100	105	◎
			カラゲナン	0.1%	100	111	◎
グリセロール	1%	100	97	◎			
PEG300	0.1%	100	109	◎			

10

20

30

## 【0055】

注：7日後の残存活性が0～30%を×、30～50%を○、50～70%を△、70%よりも大きい場合を◎とした。

## 【実施例 4】

## 【0056】

本発明ブロッキング剤の単独及び混合使用によるブロッキング作用の検討

40

## 1) 方法

## (1) ブロッキング溶液の調製

表4に記載の試験物質 (ブロッキング剤) を用い、実施例 2 と同様にブロッキング溶液を調製して使用した。

## 【0057】

なお、トウモロコシタンパク質 (加水分解物) およびコメヌカタンパク質 (加水分解物) は、実施例 2 と同一のものを使用した。

## (2) 固相化ヤギ抗マウスIgG抗体プレートの作成及び保存

上記 (1) で調製したブロッキング溶液を用い、実施例 1 と同様に固相化ヤギ抗マウスIgG抗体プレートを作成した。

50

## (3) 固相化抗体の活性測定方法

上記(2)で作成した固相化抗体プレートの各ウェルに、0.5%トウモロコシタンパク質 0.15mol/l、塩化ナトリウム及び防腐剤として0.05%プロクリン300を含む50mmol/l トリス塩酸緩衝液(Tris-HCl: pH7.3~7.7)(以下、TBS反応液と記載する)を100 $\mu$ Lずつ加えた。続いて、所定の各ウェルにTBS反応液で6.25ng/mLに調製したマウスIgGを25 $\mu$ LあるいはブランクとしてTBS反応液のみを25 $\mu$ L加え、室温(15~25 )で60分間静置して抗原抗体反応を行った。

## 【0058】

この反応終了後、洗浄液(T-TBS)で各ウェルを4回洗浄した後、T-TBS反応液あるいはTBS反応液で1000倍に調製したHRP標識ヤギ抗マウスIgG抗体溶液を各ウェルに100 $\mu$ L加え、これを室温(15~25 )で60分間静置して反応させた。

## 【0059】

反応終了後、実施例3と同一操作によって吸光度を測定した。

## 【0060】

非特異吸着量はブランクの吸光度値、特異的吸着量はマウスIgG 6.25ng/mLにおける吸光度値からブランクにおける吸光度値を減算した吸光度差(以下、吸光度差と記載する)とした。

## 2) 結果

ブロッキング剤を用いない場合には吸光度2.963と高いブランク値を示し、非特異吸着が高い結果が得られた。一方、トウモロコシタンパク質単独では吸光度0.149、添加剤としてコメヌカタンパク質を併用した群(0.01~2%)では0.059~0.118であり、いずれも低いブランク値を示し、本発明ブロッキング剤の単独使用および混合使用によりIgGの非特異吸着が大きく抑制された。

特異的吸着の指標である吸光度差は、ブロッキング剤がない場合には0.025と特異的吸着量を効率良く検出すること出来ない結果であった。一方、トウモロコシタンパク質単独では0.585、コメヌカタンパク質併用群(0.01~2%)では0.680~0.929と効率良く特異的吸着量を検出することが可能であった。

## 【0061】

以上の結果から、本発明のブロッキング剤には、抗原のプレートへの非特異的吸着を防止するとともに、抗原抗体反応の反応性を向上させる効果があることが分かった。

## 【0062】

## 【表4】

試験物質(ブロッキング剤)				吸光度		吸光度差
基剤	基剤濃度	添加剤	添加剤濃度	マウスIgG	ブランク	
なし	—	なし	—	2.988	2.963	0.025
トウモロコシタンパク質	2%	なし	—	0.734	0.149	0.585
トウモロコシタンパク質	2%	+コメヌカタンパク質	0.01%	0.831	0.118	0.713
			0.05%	0.928	0.059	0.869
			0.1%	0.830	0.065	0.765
			0.2%	0.865	0.078	0.787
			0.5%	0.771	0.091	0.680
			1%	0.915	0.103	0.812
			2%	1.033	0.104	0.929

10

20

30

40

50



专利名称(译)	稳定剂和封闭剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006047255A</a>	公开(公告)日	2006-02-16
申请号	JP2004239877	申请日	2004-08-19
[标]申请(专利权)人(译)	生化学工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	生化学工业株式会社		
[标]发明人	石丸剛 宮浦修一		
发明人	石丸 剛 宮浦 修一		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
FI分类号	G01N33/543.501.J G01N33/531.B		
代理人(译)	堀口勉		
优先权	2003296005 2003-08-20 JP 2004093863 2004-03-26 JP 2004197049 2004-07-02 JP		
其他公开文献	JP4505281B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

要解决的问题：在使用特异性结合对的试验中，提供用于增强特定结合对形成物质在储存期间的稳定性的稳定剂和用于防止非特异性吸附的封闭剂。形成物质。Z SOLUTION：为形成特异性结合对的物质提供稳定剂，该物质含有植物来源的多肽作为活性成分，并且在使用特异性的测定中提供用于防止非特异性吸附的阻断剂。结合成对物质；本发明提供了一种组合物，其用于测定，使用特异性结合对形成物质，其含有特异性结合对形成物质和稳定剂或封闭剂；本发明提供了一种试剂盒，用于使用特异性结合对形成物质的试验中，该试剂盒含有用于防止非特异性吸收的稳定剂或封闭剂。Z

【表 1】

	試験物質	試験濃度	残存活性(%)			評価	
			day0	day5	day12		
対照	BSA	1%	100	73	68	○	
	ゼラチン	0.1%	100	40	14	×	
	カゼイン	0.1%	100	83	69	○	
	脱脂粉乳	0.1%	100	51	17	×	
	無添加	・	100	24	4	×	
実験群	ダイズタンパク質	ペプトン	1%	100	99	95	◎
		酵素分解物	1%	100	101	90	◎
		酸分解物	1%	100	88	69	○
	コムギタンパク質 (誘導体)	加水分解物	1%	100	78	74	◎
		加水分解物誘導体	1%	100	80	62	○
	ジャガイモタンパク質	加水分解物	1%	100	91	78	◎
	トウモロコシタンパク質	加水分解物	1%	100	・	86	◎