

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6282478号  
(P6282478)

(45) 発行日 平成30年2月21日(2018.2.21)

(24) 登録日 平成30年2月2日(2018.2.2)

(51) Int.Cl.	F 1
<b>GO 1 N 33/531 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/531 B

請求項の数 2 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2014-22659 (P2014-22659)	(73) 特許権者	504255685 国立大学法人京都工芸繊維大学
(22) 出願日	平成26年2月7日(2014.2.7)		京都府京都市左京区松ヶ崎橋上町1番地
(65) 公開番号	特開2015-148558 (P2015-148558A)	(73) 特許権者	000004341
(43) 公開日	平成27年8月20日(2015.8.20)		日油株式会社
審査請求日	平成28年12月2日(2016.12.2)		東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号
		(74) 代理人	100081514 弁理士 酒井 一
		(74) 代理人	100082692 弁理士 蔵合 正博
		(72) 発明者	熊田 陽一 京都府京都市左京区松ヶ崎橋上町1 京都工芸繊維大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛋白質吸着抑制剤及び蛋白質吸着抑制方法

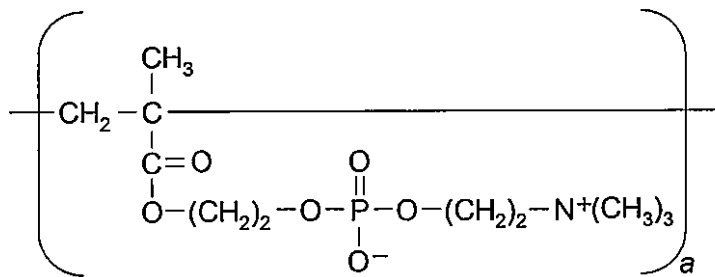
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

酵素反応あるいは抗原抗体反応を利用した免疫学的測定法に用いる蛋白質吸着抑制剤であって、

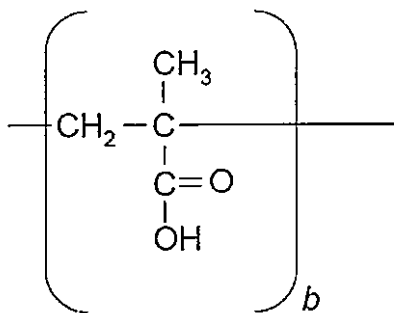
式(a)及び式(b)で表される構成単位を有し、かつ式中a及びbは $(b / (a + b)) \times 100 = 30 \sim 70$ の関係を示すポリマー(A)と、式(c)及び式(d)で表される構成単位を有し、かつ式中c及びdは $(d / (c + d)) \times 100 = 30 \sim 70$ の関係を示すポリマー(B)との混合物を含み、該ポリマー(A)と該ポリマー(B)の混合割合が、質量比で3 : 7 ~ 7 : 3であることを特徴とする蛋白質吸着抑制剤。

## 【化 1】



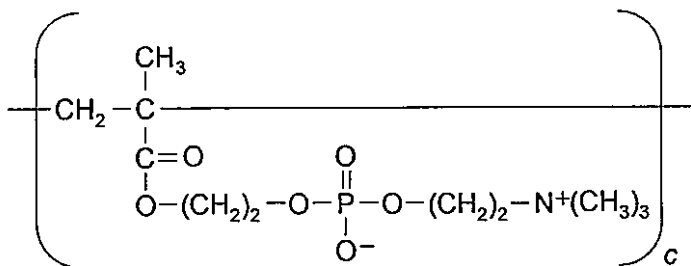
. . . 式 (a)

10



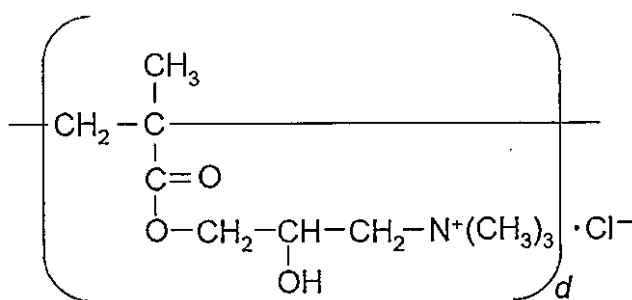
. . . 式 (b)

20



. . . 式 (c)

30



. . . 式 (d)

40

## 【請求項 2】

酵素反応あるいは抗原抗体反応を利用した免疫学的測定法において、親水性ポリスチレン基材の固相への蛋白質の吸着を抑制するために、請求項 1 記載の蛋白質吸着抑制剤を該酵素反応あるいは抗原抗体反応の系内に存在させることを特徴とする蛋白質吸着抑制方法

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

【0001】

50

本発明は、生物学的特異反応を利用した測定法等に用いる蛋白質吸着抑制剤及び蛋白質吸着抑制方法に関し、更に詳細には、臨床検査の分野で広く用いられる免疫学的測定法等において、例えば、抗体結合固相、抗原結合固相および固相自体への蛋白質等の成分の吸着を防ぐ蛋白質吸着抑制剤及び蛋白質吸着抑制方法に関する。

【背景技術】

【0002】

臨床診断薬等の分野で広く使用されている免疫学的測定法は、一般には *two-site* 法（サンドイッチ測定法）による固相法が使われている。この測定方法は、測定すべき物質（被検物質， $A_g$ ）のエピトープを異にする2種類の抗体（ $A_{b_1}$ ， $A_{b_2}$ ）を用いる。まず、合成高分子などからなる固相（ $S_P$ ）の表面に $A_{b_1}$ を固定し、これに $A_g$ を加えて結合させる。次いで、標識した抗体（ $A_{b_2}^*$ ）を反応させた後、洗浄して遊離 $A_{b_2}^*$ を除去し、固相に結合した $A_{b_2}^*$ （結合型， $B$ ）の標準活性を測定する。この場合 $A_g$ 量に応じて $B$ が増加し、両者間に標準曲線が得られる。この標準曲線より検体中の抗原量を測定する。また、抗原と抗体とを逆にして、即ち標識抗原を用いて、検体中の抗体量を測定する方法も用いられている（ $A_{g_1}$ ， $A_{g_2}^*$ および $A_b$ を用いて測定）。これらの標識には、通常酵素、蛍光物質あるいは発光物質等が用いられている。

これらサンドイッチ測定法の感度を左右する主な要因の1つは標識抗体の抗体結合固相への吸着あるいは標識抗原の抗原結合固相への吸着である。これらの吸着は、標識に用いた酵素、蛍光物質あるいは発光物質等の性質に一部依存することは十分予測しうる。酵素標識抗体の吸着は、アルカリフォスファターゼ標識抗体、グルコースオキシダーゼ標識抗体、ペルオキシダーゼ標識抗体のいずれの抗体も加えた量の3万分の1あるいはそれ以下であり、 $D$ -ガラクトシダーゼ標識抗体の非特異的吸着は2000分の1である（非特許文献1）。これらの吸着はサンドイッチ法における感度の低下および再現性の欠如の原因となっている。

【0003】

従来、これらの吸着を防止するために、免疫学的測定法を $pH 5 \sim 6$ の弱酸性緩衝液で行なう方法や、 $A_{b_1}$ を吸着させた後で、固相の余分な蛋白質結合部位を卵白アルブミン、ウシ血清アルブミン、ウシ胎児血清、正常血清等の蛋白質成分を用いて蛋白質吸着を抑制する方法が知られている。しかしながら、弱酸性での操作や各種蛋白質で蛋白質吸着を抑制する場合、その蛋白質吸着防止能は十分ではなく、また、市販の卵白アルブミン、ウシ血清アルブミン、ウシ胎児血清等には、しばしば免疫グロブリン、酵素あるいはホルモン等の混入があり、反応に影響をあたえ、分析値に誤差を生じさせるなどの問題も発生していた。

そのような背景から、我々は、生体成分を含まない合成高分子系の蛋白質吸着抑制剤を検討し、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンを有する重合体が比較的良好的な蛋白質吸着抑制効果を示すことを見出している（特許文献1）。しかしながら、臨床診断等の分野では更に優れた蛋白質吸着抑制剤の開発が望まれている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開平7-83923号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】酵素免疫測定法 医学書院 1987年5月1日 石川栄治著

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の課題は、生物学的特異反応を利用した測定系に影響を与えず、即ち、酵素、蛍光物質あるいは化学酵素物質等の標識物質および測定対象物質に限定されることなく、蛋白質の抗体結合固相への吸着、抗原結合固相への吸着あるいは固相への吸着等の蛋白質吸

10

20

30

40

50

着を抑制し、高い精度で目的物質を免疫学的に分析することを可能にする蛋白質吸着抑制剤及びそれを用いた蛋白質吸着抑制方法を提供することにある。

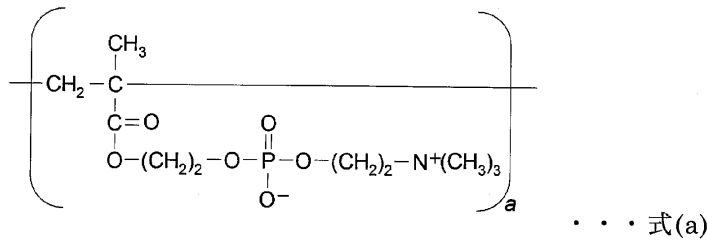
【課題を解決するための手段】

【0007】

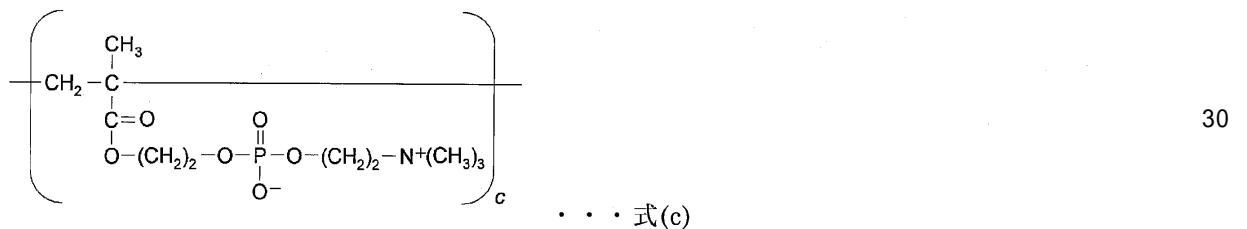
本発明によれば、生物学的特異反応を利用した測定法に用いる蛋白質吸着抑制剤であって、式(a)及び式(b)で表される構成単位を有し、かつ式中a及びbは $(b / (a + b)) \times 100 = 30 \sim 70$ の関係を示すポリマー(A)と、式(c)及び式(d)で表される構成単位を有し、かつ式中c及びdは $(d / (c + d)) \times 100 = 30 \sim 70$ の関係を示すポリマー(B)との混合物を含み、該ポリマー(A)と該ポリマー(B)の混合割合が、質量比で3 : 7 ~ 7 : 3であることを特徴とする蛋白質吸着抑制剤(以下、本発明の抑制剤と略すことがある)が提供される。

10

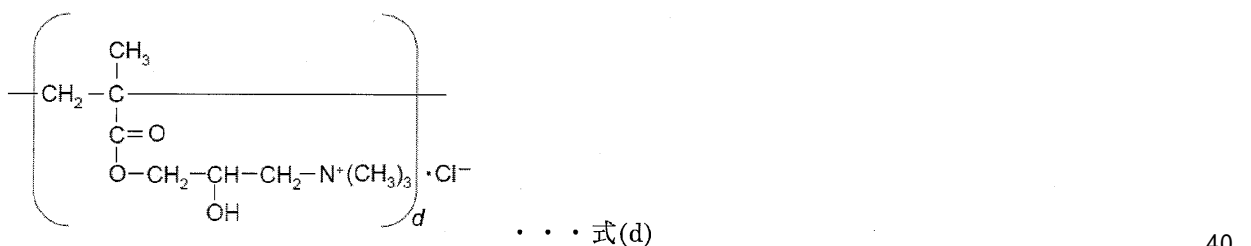
【化1】



20



30



40

また本発明によれば、生物学的特異反応を利用した測定法において、親水性ポリスチレン基材の固相への蛋白質の吸着を抑制するために、本発明の抑制剤を該生物学的特異反応系内に存在させることを特徴とする蛋白質吸着抑制方法が提供される。

【発明の効果】

【0008】

本発明の抑制剤は、上記特定割合の特定のポリマー(A)及び特定のポリマー(B)からなる混合物を含むので、生物学的特異反応を利用した種々の免疫学的測定系等において影響を与えず、高い精度で蛋白質吸着を抑制し、再現性良く、高い精度で目的物質を分析することを可能にできる。

50

## 【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】実施例10で実施したELISA試験における甲状腺刺激ホルモン濃度と、450nmにおける吸光度との関係を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0010】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の抑制剤は、例えば、蛋白質、ポリペプチド、ステロイド、脂質、ホルモン、更に具体的には各種抗原、抗体、レセプター、酵素等の一般に酵素反応あるいは免疫グロブリンの抗原抗体反応を利用して測定する免疫学的測定法等の生物学的特異反応を利用した測定法において使用可能な試薬である。具体的には例えば、公知の放射免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(EIA)、蛍光免疫測定法(FIA)、ラテックス比濁法等、特に好ましくは酵素免疫測定法(EIA)、蛍光免疫測定法(FIA)、ラテックス比濁法等に適用することができる。これらの公知の免疫学的測定法において、固相表面に抗体あるいは抗原を結合させた後、固相の余分な蛋白質結合部位を、本発明の抑制剤の有効成分である後述するポリマー(A)及びポリマー(B)からなる混合物により、蛋白質の吸着を抑制することができる。

10

【0011】

本発明の抑制剤は、上記式(a)及び上記式(b)で表される構成単位を有し、かつ式中a及びbは $(b / (a + b)) \times 100 = 30 \sim 70$ の関係を示す、アニオン系のポリマー(A)と、上記式(c)及び上記式(d)で表される構成単位を有し、かつ式中c及びdは $(d / (c + d)) \times 100 = 30 \sim 70$ の関係を示す、カチオン系のポリマー(B)との混合物を含む。

20

ポリマー(A)の上記構成単位a及びbの関係が上記範囲外である場合、もしくはポリマー(B)の上記構成単位c及びdの関係が上記範囲外である場合は、本発明における優れた蛋白質吸着抑制作用が著しく低下するおそれがある。

【0012】

ポリマー(A)及びポリマー(B)それぞれは、上記必須の構成単位の他に、非イオン性であり、かつ本発明の蛋白質吸着抑制効果に影響を及ぼさない程度であれば、重合可能な他のビニルモノマー成分を重合させた他の構成単位を有していても良い。

ポリマー(A)において、上記式(a)及び上記式(b)で表される構成単位の合計割合は80~100mol%が好ましい。また、ポリマー(B)において、上記式(c)及び上記式(d)で表される構成単位の合計割合は80~100mol%が好ましい。

30

従って、ポリマー(A)及び/又はポリマー(B)が上記他の構成単位を有する場合には、その割合は、各々20mol%以内であることが好ましい。

【0013】

ポリマー(A)及びポリマー(B)それぞれの数平均分子量は、蛋白質吸着抑制剤としてのハンドリング性の点から、好ましくは1000~10000000、特に好ましくは2000~20000000の範囲である。

【0014】

ポリマー(A)は、例えば、特定の重合開始剤の存在下、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(以下、MPCと略す)とメタクリル酸(以下、MAcと略す)とを重合させる方法、もしくは必要に応じて共重合可能な他のビニルモノマーとを重合させる方法により調製することができる。

40

ポリマー(B)は、例えば、特定の重合開始剤の存在下、MPCとN,N,N-トリメチル-N-(2-ヒドロキシ-3-メタクリロイルオキシプロピル)アンモニウムクロライド(以下、QAと略す)とを重合させる方法、もしくは必要に応じて共重合可能な他のビニルモノマーとを重合させる方法により調製することができる。

【0015】

上記ポリマー(A)又はポリマー(B)の調製において必要に応じて用いることができる共重合可能な他のビニルモノマーとしては、例えば(メタ)アクリル酸n-ブチル、(メタ)

50

アクリル酸メチル、(メタ)アクリル酸エチル、(メタ)アクリル酸ブチル、(メタ)アクリル酸ペンチル、(メタ)アクリル酸ヘキシル、(メタ)アクリル酸ヘプチル、(メタ)アクリル酸オクチル、(メタ)アクリル酸トリデシル、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、スチレン、 $\alpha$ -メチルスチレン、メチル核置換スチレン、クロロ核置換スチレン、塩化ビニル、塩化ビニリデン、エチレン、プロピレン、イソブチレン、酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル、エチルビニルエーテル、*n*-ブチルビニルエーテル、ジエチルイタコネート、ジ-*n*-ブチルイタコネートを挙げることができ、特にメタクリル酸エステル類を好ましく挙げることができる。

#### 【0016】

上記ポリマー(A)又はポリマー(B)の調製において用いる重合開始剤としては、通常のラジカル重合開始剤であれば特に限定されるものではなく、例えば、2,2'-アゾビスイソブチロニトリル、過酸化ベンゾイル、ジイソプロピルペルオキシジカーボネート、*t*-ブチルペルオキシ-2-エチルヘキサノエート、*t*-ブチルペルオキシピバレート、*t*-ブチルペルオキシジイソブチレート、過硫酸塩又は過硫酸-亜硫酸水素塩が挙げられる。

重合開始剤の使用量は、全原料モノマー100質量部に対して0.01~10質量部が好ましく、特に0.1~5質量部が望ましい。

#### 【0017】

上記ポリマー(A)又はポリマー(B)を調製する際の重合条件は、好ましくは30~80、特に好ましくは40~70において2~72時間である。この際、重合反応をより円滑に行なうために溶媒を用いてもよく、該溶媒としては、例えば、水、メタノール、エタノール、プロパノール、*t*-ブタノール、ベンゼン、トルエン、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、クロロホルム又はこれらの混合物を挙げることができる。

また、得られる各ポリマーの精製は公知の方法により行うことができる。

#### 【0018】

本発明の抑制剤は、上記ポリマー(A)及びポリマー(B)を特定割合で混合した混合物を有効成分とする。ポリマー(A)とポリマー(B)の混合割合は、質量比で3:7~7:3である。混合割合がこの範囲外であると、本発明における優れた蛋白質吸着抑制作用が著しく低下するおそれがある。

#### 【0019】

本発明の抑制剤は、有効成分である前記混合物を含むものであれば特に限定されないが、通常、該混合物を溶媒に溶解させて使用される。該溶媒としては、例えば、免疫学的測定方法に使用することができる緩衝液であれば全て用いることができる。具体的には、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、HEPES緩衝液、各種生理食塩水等を好ましく挙げることができる。

本発明の抑制剤は、事前にポリマー(A)を含む溶媒と、ポリマー(B)を含む溶媒とを混合してイオンコンプレックスを形成させて用いるのが好ましい。

本発明の抑制剤を溶媒に溶解させて使用する場合の、有効成分である上記混合物の濃度は、0.0001~5質量%であることが好ましい。

#### 【0020】

本発明の抑制剤を用いて、生物学的特異反応を利用した測定法における、蛋白質の吸着を抑制する固相の材質は特に限定されるものではないが、例えば、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、アクリル、ポリメチルメタクリレート、ガラス、金属、セラミック、シリコンラバー等を挙げることができ、特に、ポリスチレンが好ましく、更には、コロナ放電、電子線等で表面が親水化処理されたポリスチレンが好ましい。また、これら材質の形状は特に限定されるものではなく、例えば、試験管、タイタープレート、ラテックス、磁性微粒子を挙げることができる。

#### 【0021】

本発明の蛋白質吸着抑制方法は、生物学的特異反応を利用した測定法において、親水性ポリスチレン基材の固相への蛋白質の吸着を抑制するために、本発明の抑制剤を該生物学的特異反応系内に存在させることを特徴とする。例えば、各種免疫学的測定法で使用する

10

20

30

40

50

親水性ポリスチレン基材の固相表面に、抗体あるいは抗原を結合させる前に、本発明の抑制剤を該系内に存在させれば良い。

具体的には、目的物質の含まれる血清、あるいは標識抗体または標識抗原を、添加する以前であればどの時点で存在させても良い。また、血清中の分析目的物質の固相への吸着が問題とならない場合においても、標識抗体または標識抗原を添加する以前に本発明の抑制剤をその系内に存在させることができる。更に分析を実施する際の全ての溶液に本発明の抑制剤を添加して使用することもできる。

この際、本発明の抑制剤の使用量は、有効成分である上記混合物換算で、0.0001～5重量%であるのが好ましい。

#### 【実施例】

##### 【0022】

以下、実施例に基づき本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。なお、例中のポリマーは表1に示されるポリマーを合成例に従って合成し使用した。また、各種測定は以下に示すとおり行った。

合成例1：ポリマー(A)に相当するポリマー(A1)の合成

MPC 30.96 g(0.105mol)、及びMAc 9.04 g(0.105mol)を純水160 gに溶解し、温度計と冷却管を付けた500mLの4つ口フラスコに入れて30分間窒素を吹き込んだ。その後、70℃でスクシニックパーオキサイド種1.56 g加えて7時間重合反応させた。反応終了後、透析膜精製し、無色透明のポリマー(A1)水溶液を得た。ポリマー(A1)を構成する構成単位組成のモル比を表1に示す。

##### 【0023】

合成例2：ポリマー(A)に相当するポリマー(A2)及び(A3)の合成

モノマー仕込量を変更した以外は、合成例1と同様に表1に示す構成単位組成のポリマー(A2)及び(A3)を調製した。

##### 【0024】

合成例3：ポリマー(B)に相当するポリマー(B1)の合成

MPC 22.15g(0.075mol)、及びQA 17.85g(0.075mol)を純水210 gに溶解し、温度計と冷却管を付けた500mLの4つ口フラスコに入れて30分間窒素を吹き込んだ。その後、70℃で2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)ジヒドロクロライド0.373 g加えて2時間重合反応させた。反応終了後、透析膜精製し、無色透明のポリマー(B1)水溶液を得た。ポリマー(B1)を構成する構成単位組成のモル比を表1に示す。

##### 【0025】

合成例4：ポリマー(B)に相当するポリマー(B2)及び(B3)の合成

モノマー仕込量を変更した以外は、合成例3と同様に表1に示す構成単位組成のポリマー(B2)及び(B3)を合成した。

##### 【0026】

合成例5：ポリマー(A)に相当しないポリマー(C)及び(D)の合成

モノマー仕込量を変更した以外は、合成例1と同様に表1に示す構成単位組成のポリマー(C)及び(D)を調製した。

##### 【0027】

合成例6：ポリマー(B)に相当しないポリマー(E)及び(F)の合成

モノマー仕込量を変更した以外は、合成例3と同様に表1に示す構成単位組成のポリマー(E)及び(F)を合成した。

##### 【0028】

10

20

30

40

【表1】

ポリマー名称	ポリマー構成単位組成(mol比)		
	式(a)又は式(c)の構成単位	式(b)の構成単位	式(d)の構成単位
ポリマー(A1)	30	70	—
ポリマー(A2)	50	50	—
ポリマー(A3)	70	30	—
ポリマー(B1)	70	—	30
ポリマー(B2)	50	—	50
ポリマー(B3)	30	—	70
ポリマー(C)	20	80	—
ポリマー(D)	80	20	—
ポリマー(E)	20	—	80
ポリマー(F)	80	—	20

10

## 【0029】

<蛋白質吸着抑制効果の測定方法>

後述の例で調製した蛋白質吸着抑制剤を96穴ポリスチレン製プレートに300  $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、25  $^{\circ}\text{C}$ で3時間インキュベートした後、アスピレーターで液を除去した。その後、リン酸緩衝液(pH7.2)を300  $\mu\text{L}/\text{well}$ 加え、直ちにアスピレーターで水溶液を除去する工程を5回繰り返す、プレート表面の洗浄を行った。洗浄後、ヒト血清10  $\mu\text{L}$ と蛋白質吸着抑制剤90  $\mu\text{L}$ を混合し、100  $\mu\text{L}/\text{well}$ をプレートに加え、25  $^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベートした後、アスピレーターで液を除去した。その後、リン酸緩衝液(pH7.2)を300  $\mu\text{L}/\text{well}$ 加え、直ちにアスピレーターで水溶液を除去する工程を5回繰り返す、プレート表面の洗浄を行った。洗浄を行ったプレートに西洋ワサビ由来ペルオキシターゼ標識抗ヒトIgG抗体溶液(市販品を、2wt%BSA、0.05wt%ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレートを含むリン酸緩衝液(pH7.2)で5000倍希釈)を100  $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、25  $^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベートした後、アスピレーターで液を除去した。その後、0.05wt%ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレートを含むリン酸緩衝液(pH7.2)を300  $\mu\text{L}/\text{well}$ 加え、直ちにアスピレーターで水溶液を除去する工程を5回繰り返す、プレート表面の洗浄を行った。次に、TMB ULTRA SENSITIVE SUBSTRATE (Moss, inc.)を100  $\mu\text{L}/\text{well}$ プレートに添加し、25  $^{\circ}\text{C}$ で15時間インキュベートした。0.3M硫酸を100  $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、反応を停止した。

20

30

その後、波長450nm(副波長650nm)の吸光度を測定した。吸光度により、蛋白質の基材への吸着抑制効果を評価した。吸光度が低い方が、蛋白質吸着抑制効果が高いことを示す。なお、96穴ポリスチレン製プレートは、表面親水性プレートとしてAGC社製の表面浸水化プレート(cat.3861-096)を用いた。

## 【0030】

実施例1-1~1-3

表1に示すポリマー(A1)をアニオン系ポリマーとし、ポリマー(B1)をカチオン系ポリマーとして用い、質量比が表2に示す3:7から7:3になるよう混合した。ポリマー混合物の終濃度が1wt%になるようリン酸緩衝液(pH7.2)で希釈し、蛋白質吸着抑制剤を調製した。得られた蛋白質吸着抑制剤を用いて、上記蛋白質吸着抑制効果の測定を行った。結果を表2に示す。

40

## 【0031】

比較例1-1~1-4

表1に示すポリマー(A1)とポリマー(B1)の質量比を、表2に示すとおり変更した以外は、実施例1-1~1-3と同様に蛋白質吸着抑制剤を調製し、測定を行った。結果を表2に示す。

50

【 0 0 3 2 】

【表 2】

	質 量 比		吸光度
	ポリマー(A1)	ポリマー(B1)	
実施例 1 - 1	7	3	0.036
実施例 1 - 2	5	5	0.036
実施例 1 - 3	3	7	0.037
比較例 1 - 1	100	0	1.810
比較例 1 - 2	8	2	0.420
比較例 1 - 3	2	8	0.632
比較例 1 - 4	0	100	1.760

10

【 0 0 3 3 】

実施例 2 - 1 ~ 2 - 3

表 1 に示すポリマー (A1) をアニオン系ポリマーとし、ポリマー (B2) をカチオン系ポリマーとして用い、質量比が表 3 に示す 3 : 7 から 7 : 3 になるよう混合した。ポリマー混合物の終濃度が 1 wt% になるようリン酸緩衝液 (pH 7.2) で希釈し、蛋白質吸着抑制剤を調製した。得られた蛋白質吸着抑制剤を用いて、上記蛋白質吸着抑制効果の測定を行った。結果を表 3 に示す。

20

【 0 0 3 4 】

比較例 2 - 1 ~ 2 - 4

表 1 に示すポリマー (A1) とポリマー (B2) の質量比を、表 3 に示すとおり変更した以外は、実施例 2 - 1 ~ 2 - 3 と同様に蛋白質吸着抑制剤を調製し、測定を行った。結果を表 3 に示す。

【 0 0 3 5 】

【表 3】

	質 量 比		吸光度
	ポリマー(A1)	ポリマー(B2)	
実施例 2 - 1	7	3	0.038
実施例 2 - 2	5	5	0.035
実施例 2 - 3	3	7	0.036
比較例 2 - 1	100	0	1.776
比較例 2 - 2	8	2	0.451
比較例 2 - 3	2	8	0.592
比較例 2 - 4	0	100	1.832

30

【 0 0 3 6 】

実施例 3 - 1 ~ 3 - 3

表 1 に示すポリマー (A1) をアニオン系ポリマーとし、ポリマー (B3) をカチオン系ポリマーとして用い、質量比が表 4 に示す 3 : 7 から 7 : 3 になるよう混合した。ポリマー混合物の終濃度が 1 wt% になるようリン酸緩衝液 (pH 7.2) で希釈し、蛋白質吸着抑制剤を調製した。得られた蛋白質吸着抑制剤を用いて、上記蛋白質吸着抑制効果の測定を行った。結果を表 4 に示す。

40

【 0 0 3 7 】

比較例 3 - 1 ~ 3 - 4

表 1 に示すポリマー (A1) とポリマー (B3) の質量比を、表 4 に示すとおり変更した以外は、実施例 3 - 1 ~ 3 - 3 と同様に蛋白質吸着抑制剤を調製し、測定を行った。結果を表 4 に示す。

50

【 0 0 3 8 】

【表 4】

	質 量 比		吸光度
	ポリマー(A1)	ポリマー(B3)	
実施例 3 - 1	7	3	0.046
実施例 3 - 2	5	5	0.039
実施例 3 - 3	3	7	0.041
比較例 3 - 1	100	0	1.821
比較例 3 - 2	8	2	0.441
比較例 3 - 3	2	8	0.648
比較例 3 - 4	0	100	1.795

10

【 0 0 3 9 】

実施例 4 - 1 ~ 4 - 3

表 1 に示すポリマー (A2) をアニオン系ポリマーとし、ポリマー (B1) をカチオン系ポリマーとして用い、質量比が表 5 に示す 3 : 7 から 7 : 3 になるよう混合した。ポリマー混合物の終濃度が 1 wt% になるようリン酸緩衝液 (pH 7.2) で希釈し、蛋白質吸着抑制剤を調製した。得られた蛋白質吸着抑制剤を用いて、上記蛋白質吸着抑制効果の測定を行った。結果を表 5 に示す。

20

【 0 0 4 0 】

比較例 4 - 1 ~ 4 - 4

表 1 に示すポリマー (A2) とポリマー (B1) の質量比を、表 5 に示すとおり変更した以外は、実施例 4 - 1 ~ 4 - 3 と同様に蛋白質吸着抑制剤を調製し、測定を行った。結果を表 5 に示す。

【 0 0 4 1 】

【表 5】

	質 量 比		吸光度
	ポリマー(A2)	ポリマー(B1)	
実施例 4 - 1	7	3	0.046
実施例 4 - 2	5	5	0.037
実施例 4 - 3	3	7	0.041
比較例 4 - 1	100	0	1.776
比較例 4 - 2	8	2	0.493
比較例 4 - 3	2	8	0.621
比較例 4 - 4	0	100	1.769

30

【 0 0 4 2 】

実施例 5 - 1 ~ 5 - 3

表 1 に示すポリマー (A2) をアニオン系ポリマーとし、ポリマー (B2) をカチオン系ポリマーとして用い、質量比が表 6 に示す 3 : 7 から 7 : 3 になるよう混合した。ポリマー混合物の終濃度が 1 wt% になるようリン酸緩衝液 (pH 7.2) で希釈し、蛋白質吸着抑制剤を調製した。得られた蛋白質吸着抑制剤を用いて、上記蛋白質吸着抑制効果の測定を行った。結果を表 6 に示す。

40

【 0 0 4 3 】

比較例 5 - 1 ~ 5 - 4

表 1 に示すポリマー (A2) とポリマー (B2) の質量比を、表 6 に示すとおり変更した以外は、実施例 5 - 1 ~ 5 - 3 と同様に蛋白質吸着抑制剤を調製し、測定を行った。結果を表 6 に示す。

50

【 0 0 4 4 】

【表 6】

	質 量 比		吸光度
	ポリマー (A2)	ポリマー (B2)	
実施例 5 - 1	7	3	0.039
実施例 5 - 2	5	5	0.049
実施例 5 - 3	3	7	0.045
比較例 5 - 1	100	0	1.823
比較例 5 - 2	8	2	0.439
比較例 5 - 3	2	8	0.489
比較例 5 - 4	0	100	1.834

10

【 0 0 4 5 】

実施例 6 - 1 ~ 6 - 3

表 1 に示すポリマー (A2) をアニオン系ポリマーとし、ポリマー (B3) をカチオン系ポリマーとして用い、質量比が表 7 に示す 3 : 7 から 7 : 3 になるよう混合した。ポリマー混合物の終濃度が 1 wt% になるようリン酸緩衝液 (pH 7.2) で希釈し、蛋白質吸着抑制剤を調製した。得られた蛋白質吸着抑制剤を用いて、上記蛋白質吸着抑制効果の測定を行った。結果を表 7 に示す。

20

【 0 0 4 6 】

比較例 6 - 1 ~ 6 - 4

表 1 に示すポリマー (A2) とポリマー (B3) の質量比を、表 7 に示すとおり変更した以外は、実施例 6 - 1 ~ 6 - 3 と同様に蛋白質吸着抑制剤を調製し、測定を行った。結果を表 7 に示す。

【 0 0 4 7 】

【表 7】

30

	質 量 比		吸光度
	ポリマー (A2)	ポリマー (B3)	
実施例 6 - 1	7	3	0.042
実施例 6 - 2	5	5	0.047
実施例 6 - 3	3	7	0.039
比較例 6 - 1	100	0	1.793
比較例 6 - 2	8	2	0.462
比較例 6 - 3	2	8	0.447
比較例 6 - 4	0	100	1.826

40

【 0 0 4 8 】

実施例 7 - 1 ~ 7 - 3

表 1 に示すポリマー (A3) をアニオン系ポリマーとし、ポリマー (B1) をカチオン系ポリマーとして用い、質量比が表 8 に示す 3 : 7 から 7 : 3 になるよう混合した。ポリマー混合物の終濃度が 1 wt% になるようリン酸緩衝液 (pH 7.2) で希釈し、蛋白質吸着抑制剤を調製した。得られた蛋白質吸着抑制剤を用いて、上記蛋白質吸着抑制効果の測定を行った。結果を表 8 に示す。

【 0 0 4 9 】

比較例 7 - 1 ~ 7 - 4

50

表 1 に示すポリマー(A3)とポリマー(B1)の質量比を、表 8 に示すとおり変更した以外は、実施例 7 - 1 ~ 7 - 3 と同様に蛋白質吸着抑制剤を調製し、測定を行った。結果を表 8 に示す。

【 0 0 5 0 】

【表 8】

	質 量 比		吸光度
	ポリマー(A3)	ポリマー(B2)	
実施例 7 - 1	7	3	0.040
実施例 7 - 2	5	5	0.039
実施例 7 - 3	3	7	0.043
比較例 7 - 1	100	0	1.817
比較例 7 - 2	8	2	0.673
比較例 7 - 3	2	8	0.435
比較例 7 - 4	0	100	1.799

10

【 0 0 5 1 】

実施例 8 - 1 ~ 8 - 3

表 1 に示すポリマー(A3)をアニオン系ポリマーとし、ポリマー(B2)をカチオン系ポリマーとして用い、質量比が表 9 に示す 3 : 7 から 7 : 3 になるよう混合した。ポリマー混合物の終濃度が 1 wt% になるようリン酸緩衝液 (pH 7.2) で希釈し、蛋白質吸着抑制剤を調製した。得られた蛋白質吸着抑制剤を用いて、上記蛋白質吸着抑制効果の測定を行った。結果を表 9 に示す。

20

【 0 0 5 2 】

比較例 8 - 1 ~ 8 - 4

表 1 に示すポリマー(A3)とポリマー(B2)の質量比を、表 9 に示すとおり変更した以外は、実施例 8 - 1 ~ 8 - 3 と同様に蛋白質吸着抑制剤を調製し、測定を行った。結果を表 9 に示す。

【 0 0 5 3 】

【表 9】

30

	質 量 比		吸光度
	ポリマー(A3)	ポリマー(B2)	
実施例 8 - 1	7	3	0.039
実施例 8 - 2	5	5	0.045
実施例 8 - 3	3	7	0.046
比較例 8 - 1	100	0	1.789
比較例 8 - 2	8	2	0.447
比較例 8 - 3	2	8	0.512
比較例 8 - 4	0	100	1.795

40

【 0 0 5 4 】

実施例 9 - 1 ~ 9 - 3

表 1 に示すポリマー(A3)をアニオン系ポリマーとし、ポリマー(B3)をカチオン系ポリマーとして用い、質量比が表 10 に示す 3 : 7 から 7 : 3 になるよう混合した。ポリマー混合物の終濃度が 1 wt% になるようリン酸緩衝液 (pH 7.2) で希釈し、蛋白質吸着抑制剤を調製した。得られた蛋白質吸着抑制剤を用いて、上記蛋白質吸着抑制効果の測定を行った。結果を表 10 に示す。

【 0 0 5 5 】

比較例 9 - 1 ~ 9 - 4

50

表 1 に示すポリマー(A3)とポリマー(B3)の質量比を、表 10 に示すとおり変更した以外は、実施例 9 - 1 ~ 9 - 3 と同様に蛋白質吸着抑制剤を調製し、測定を行った。結果を表 10 に示す。

【 0 0 5 6 】

【表 10】

	質 量 比		吸光度
	ポリマー(A3)	ポリマー(B3)	
実施例 9 - 1	7	3	0.040
実施例 9 - 2	5	5	0.045
実施例 9 - 3	3	7	0.042
比較例 9 - 1	100	0	1.787
比較例 9 - 2	8	2	0.498
比較例 9 - 3	2	8	0.453
比較例 9 - 4	0	100	1.816

10

【 0 0 5 7 】

比較例 10

蛋白質吸着抑制剤として、牛血清アルブミン(BSA)を使用した以外は、実施例 1 - 1 と同様の方法にて、蛋白質吸着抑制効果の測定を行った。なお、BSAの終濃度は 2 wt % で蛋白質吸着抑制を行った。結果を表 11 に示す。

20

【 0 0 5 8 】

【表 11】

	蛋白質吸着抑制剤	吸光度
比較例 10	2 wt % 牛血清アルブミン	0.153

【 0 0 5 9 】

比較例 11 - 1 ~ 11 - 5

表 1 に示すポリマー(C)をアニオン系ポリマーとし、ポリマー(B1)をカチオン系ポリマーとし、表 12 に示す混合比率で、実施例 1 - 1 に準じて蛋白質吸着抑制剤を調製し、測定を行った。結果を表 12 に示す。

30

【 0 0 6 0 】

【表 12】

	質 量 比		吸光度
	ポリマー(C)	ポリマー(B1)	
比較例 11 - 1	8	2	0.453
比較例 11 - 2	7	3	0.466
比較例 11 - 3	5	5	0.476
比較例 11 - 4	3	7	0.439
比較例 11 - 5	2	8	0.425

40

【 0 0 6 1 】

比較例 12 - 1 ~ 12 - 5

表 1 に示すポリマー(C)をアニオン系ポリマーとし、ポリマー(B3)をカチオン系ポリマーとし、表 13 に示す混合比率で、実施例 1 - 1 に準じて蛋白質吸着抑制剤を調製し、測定を行った。結果を表 13 に示す。

【 0 0 6 2 】

【表 1 3】

	質 量 比		吸光度
	ポリマー(C)	ポリマー(B3)	
比較例 1 2 - 1	8	2	0.488
比較例 1 2 - 2	7	3	0.459
比較例 1 2 - 3	5	5	0.521
比較例 1 2 - 4	3	7	0.417
比較例 1 2 - 5	2	8	0.572

10

## 【 0 0 6 3】

比較例 1 3 - 1 ~ 1 3 - 5

表 1 に示すポリマー(D)をアニオン系ポリマーとし、ポリマー(B1)をカチオン系ポリマーとし、表 1 4 に示す混合比率で、実施例 1 - 1 に準じて蛋白質吸着抑制剤を調製し、測定を行った。結果を表 1 4 に示す。

## 【 0 0 6 4】

【表 1 4】

	質 量 比		吸光度
	ポリマー(D)	ポリマー(B1)	
比較例 1 3 - 1	8	2	0.723
比較例 1 3 - 2	7	3	0.729
比較例 1 3 - 3	5	5	0.678
比較例 1 3 - 4	3	7	0.661
比較例 1 3 - 5	2	8	0.823

20

## 【 0 0 6 5】

比較例 1 4 - 1 ~ 1 4 - 5

表 1 に示すポリマー(D)をアニオン系ポリマーとし、ポリマー(B3)をカチオン系ポリマーとし、表 1 5 に示す混合比率で、実施例 1 - 1 に準じて蛋白質吸着抑制剤を調製し、測定を行った。結果を表 1 5 に示す。

## 【 0 0 6 6】

【表 1 5】

	質 量 比		吸光度
	ポリマー(D)	ポリマー(B3)	
比較例 1 4 - 1	8	2	0.589
比較例 1 4 - 2	7	3	0.623
比較例 1 4 - 3	5	5	0.666
比較例 1 4 - 4	3	7	0.648
比較例 1 4 - 5	2	8	0.693

40

## 【 0 0 6 7】

比較例 1 5 - 1 ~ 1 5 - 5

表 1 に示すポリマー(A1)をアニオン系ポリマーとし、ポリマー(E)をカチオン系ポリマーとし、表 1 6 に示す混合比率で、実施例 1 - 1 に準じて蛋白質吸着抑制剤を調製し、測定を行った。結果を表 1 6 に示す。

## 【 0 0 6 8】

【表 1 6】

	質 量 比		吸光度
	ポリマー(A1)	ポリマー(E)	
比較例 1 5 - 1	8	2	0.553
比較例 1 5 - 2	7	3	0.602
比較例 1 5 - 3	5	5	0.513
比較例 1 5 - 4	3	7	0.552
比較例 1 5 - 5	2	8	0.558

10

【 0 0 6 9】

比較例 1 6 - 1 ~ 1 6 - 5

表 1 に示すポリマー(A3)をアニオン系ポリマーとし、ポリマー(E)をカチオン系ポリマーとし、表 1 7 に示す混合比率で、実施例 1 - 1 に準じて蛋白質吸着抑制剤を調製し、測定を行った。結果を表 1 7 に示す。

【 0 0 7 0】

【表 1 7】

	質 量 比		吸光度
	ポリマー(A3)	ポリマー(E)	
比較例 1 6 - 1	8	2	0.521
比較例 1 6 - 2	7	3	0.547
比較例 1 6 - 3	5	5	0.572
比較例 1 6 - 4	3	7	0.561
比較例 1 6 - 5	2	8	0.577

20

【 0 0 7 1】

比較例 1 7 - 1 ~ 1 7 - 5

表 1 に示すポリマー(A1)をアニオン系ポリマーとし、ポリマー(F)をカチオン系ポリマーとし、表 1 8 に示す混合比率で、実施例 1 - 1 に準じて蛋白質吸着抑制剤を調製し、測定を行った。結果を表 1 8 に示す。

30

【 0 0 7 2】

【表 1 8】

	質 量 比		吸光度
	ポリマー(A1)	ポリマー(F)	
比較例 1 7 - 1	8	2	0.589
比較例 1 7 - 2	7	3	0.549
比較例 1 7 - 3	5	5	0.554
比較例 1 7 - 4	3	7	0.527
比較例 1 7 - 5	2	8	0.570

40

【 0 0 7 3】

比較例 1 8 - 1 ~ 1 8 - 5

表 1 に示すポリマー(A3)をアニオン系ポリマーとし、ポリマー(F)をカチオン系ポリマーとし、表 1 9 に示す混合比率で、実施例 1 - 1 に準じて蛋白質吸着抑制剤を調製し、測定を行った。結果を表 1 9 に示す。

【 0 0 7 4】

【表 19】

	質 量 比		吸光度
	ポリマー (A3)	ポリマー (F)	
比較例 18-1	8	2	0.566
比較例 18-2	7	3	0.563
比較例 18-3	5	5	0.541
比較例 18-4	3	7	0.529
比較例 18-5	2	8	0.539

10

## 【0075】

## 実施例 10 : ELISA試験

PCT/JP2009/000555記載の方法と同様に調製した配列番号1で示されるペプチドタグを融合した抗甲状腺刺激ホルモン単鎖抗体を、100 µg/mLになるようリン酸緩衝液 (pH 7.2) で希釈した。得られた溶液を、表面親水化ポリスチレン製プレートであるAGC社製の表面浸水化プレート (cat. 3861-096) に100 µL/well添加し、一晚4でインキュベートした。インキュベート後、アスピレーターで溶液を除去した。その後、リン酸緩衝液 (pH 7.2) を300 µL/well加え、直ちにアスピレーターで水溶液を除去する工程を5回繰り返し、プレート表面の洗浄を行った。実施例5-2で調製した蛋白質吸着抑制剤を300 µL/well添加し、25で1時間インキュベートした。インキュベート後、アスピレーターで液を除去した。その後、リン酸緩衝液 (pH 7.2) を300 µL/well加え、直ちにアスピレーターで水溶液を除去する工程を5回繰り返し、プレート表面の洗浄を行った。標準品として、表20に示す1000 ng/mLから0.064 ng/mL濃度の甲状腺刺激ホルモンそれぞれに、1 µg/mLのビオチン標識化抗甲状腺刺激ホルモン抗体を含む溶液を100 µL/well添加し、25で1時間インキュベートした。インキュベート後、アスピレーターで液を除去した。その後、リン酸緩衝液 (pH 7.2) を300 µL/well加え、直ちにアスピレーターで水溶液を除去する工程を5回繰り返し、プレート表面の洗浄を行った。市販のペルオキシターゼ標識ストレプトアビジンをリン酸緩衝液 (pH 7.2) で5000倍希釈し、200 µL/well添加し、25で1時間インキュベートした。アスピレーターで液を除去後、0.05 wt% ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレートを含むリン酸緩衝液 (pH 7.2) を300 µL/well加え、直ちにアスピレーターで水溶液を除去する工程を5回繰り返し、プレート表面の洗浄を行った。TMB ULTRA SENSITIVE SUBSTRATE (Moss, inc.) を100 µL/well加え、25で15分インキュベートした。続いて、0.3Mの硫酸を加え反応を停止させた後、各甲状腺刺激ホルモン濃度における反応液の波長450 nm (副波長650 nm) における吸光度を測定した。結果を図1及び表20に示す。

20

30

## 【0076】

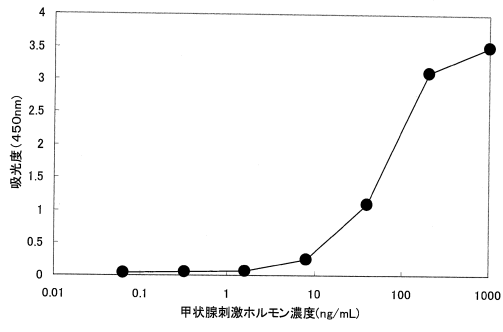
## 【表 20】

甲状腺刺激ホルモン濃度 (ng/mL)	吸光度
1000	3.512
200	3.105
40	1.106
8	0.253
1.6	0.063
0.32	0.048
0.064	0.046

40

50

【図 1】



【配列表】

0006282478000001.app

---

フロントページの続き

- (72)発明者 根本 あらんな  
京都府京都市左京区松ヶ崎橋上町1 京都工芸繊維大学内
- (72)発明者 中島 史雄  
茨城県つくば市東光台5 - 10 日油株式会社内
- (72)発明者 野田 朋澄  
茨城県つくば市東光台5 - 10 日油株式会社内
- (72)発明者 山田 智  
茨城県つくば市東光台5 - 10 日油株式会社内

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 特開2008 - 058334 (JP, A)  
特開2010 - 190602 (JP, A)  
特開2007 - 155624 (JP, A)  
特開2009 - 215348 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

专利名称(译)	蛋白质吸着抑制剤及び蛋白質吸着抑制方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP6282478B2</a>	公开(公告)日	2018-02-21
申请号	JP2014022659	申请日	2014-02-07
[标]申请(专利权)人(译)	日本油脂株式会社		
申请(专利权)人(译)	科技の国立大学法人京都研究所 日油株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	科技の国立大学法人京都研究所 日油株式会社		
[标]发明人	熊田陽一 根本あらんな 中島史雄 野田朋澄 山田智		
发明人	熊田 陽一 根本 あらんな 中島 史雄 野田 朋澄 山田 智		
IPC分类号	G01N33/531		
FI分类号	G01N33/531.B		
代理人(译)	酒井 一 ZOGO正弘		
其他公开文献	JP2015148558A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供不影响利用生物特异性反应的测量系统的蛋白质吸附抑制剤和使用其抑制蛋白质吸附的方法。溶液：蛋白质吸附抑制剤包括阴离子聚合物和聚合物（B）上的丁基（A）的混合物，聚合物（A）和聚合物（B）的混合比例为在利用生物特异性反应的测量方法中，抑制蛋白质在亲水性聚苯乙烯基材料的固相上的吸附，并且抑制蛋白质吸附3：7至7：3。【选择图】无

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6282478号 (P6282478)
(45) 発行日 平成30年2月21日 (2018. 2. 21)	(24) 登録日 平成30年2月2日 (2018. 2. 2)	
(51) Int. Cl. G 0 1 N 3 3 / 5 3 1 ( 2 0 0 6 . 0 1 ) F 1 G 0 1 N 3 3 / 5 3 1 B		
請求項の数 2 (全 18 頁)		
(21) 出願番号 特願2014-22659 (P2014-22659)	(73) 特許権者 504255685 国立大学法人京都工業繊維大学	
(22) 出願日 平成26年2月7日 (2014. 2. 7)	京都府京都市左京区松ヶ崎横上町 1 番地	
(65) 公開番号 特開2015-148558 (P2015-148558A)	(73) 特許権者 000004341 日油株式会社	
(43) 公開日 平成27年8月20日 (2015. 8. 20)	東京都渋谷区恵比寿四丁目 2 〇番 3 号	
審査請求日 平成28年12月2日 (2016. 12. 2)	(74) 代理人 100081514 弁理士 酒井 一	
	(74) 代理人 100082692 弁理士 蔵合 正博	
	(72) 発明者 熊田 陽一 京都府京都市左京区松ヶ崎横上町 1 京都 工業繊維大学内	
最終頁に続く		

(54) 【発明の名称】 蛋白質吸着抑制剤及び蛋白質吸着抑制方法