

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2006/011543

発行日 平成20年5月1日(2008.5.1)

(43) 国際公開日 平成18年2月2日(2006.2.2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 E	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 B	
	GO 1 N 33/53 U	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 13 頁)

出願番号	特願2006-527838 (P2006-527838)	(71) 出願人	399115851 株式会社先端生命科学研究所 埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2005/013812	(74) 代理人	100062007 弁理士 川口 義雄
(22) 国際出願日	平成17年7月28日(2005.7.28)	(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(31) 優先権主張番号	特願2004-223019 (P2004-223019)	(74) 代理人	100140523 弁理士 渡邊 千尋
(32) 優先日	平成16年7月30日(2004.7.30)	(74) 代理人	100119253 弁理士 金山 賢教
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100103920 弁理士 大崎 勝真
		(74) 代理人	100124855 弁理士 坪倉 道明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プローブ複合体

(57) 【要約】

【課題】 本発明の目的は高感度の免疫測定法に用いることができる高機能であり、かつ可溶性の感度の高いプローブ複合体を提供することである。

【解決手段】 担体に親水性の仲介物質を結合させ、その仲介物質に抗体及びビオチン、ハプテンまたは低分子量のペプチドなどの検出マーカーを結合させることにより、高感度なプローブ複合体を作製し得る。また、担体に親水性の仲介物質を結合させることにより、多くのハプテン分子を結合させ、且つプローブ複合体全体として親水性となるため、非特異的な反応を起こさない、高機能なプローブ複合体が得られる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

担体に親水性の仲介物質が結合し、仲介物質にプローブおよび検出マーカが結合したプローブ複合体。

【請求項 2】

検出マーカがビオチンである請求項 1 に記載のプローブ複合体。

【請求項 3】

検出マーカがハプテンである請求項 1 に記載のプローブ複合体。

【請求項 4】

検出マーカが放射性同位体を有するものである請求項 1 に記載のプローブ複合体。

10

【請求項 5】

検出マーカが抗体との結合能を有する物質である請求項 1 に記載のプローブ複合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、担体に仲介物質を介してプローブおよびハプテンまたは低分子ペプチドなどの検出マーカが結合したプローブ複合体作製の技術に関するものであり、作製されたプローブ複合体は酵素免疫測定法や免疫組織化学などの免疫反応を利用する免疫測定に広く用いられる。

【背景技術】

20

【0002】

免疫組織化学法や免疫測定法は抗原と抗体の免疫反応を利用して、生体内の自己の抗原あるいは外来抗原を検出する方法として用いられている。これらの方法は特異性と感度が高いため、生体内に存在する微量な物質を単離することなく、検出することができる。

【0003】

免疫組織化学法は抗原と抗体の特異的な反応を用いて、目的とする抗原の細胞内の局在や組織内での局在を検出する手法である。一般に広く使用されているABC法による免疫組織化学法は次のような工程で行う。凍結組織やパラフィン固定した組織から組織切片を作製する。次に非特異的な結合を抑えるため、牛血清アルブミンなどでブロッキングを行う。これに目的の抗原に結合する抗体とビオチンを結合させたビオチン化抗体を反応させ、抗原とビオチン化抗体の免疫複合体が形成される。この免疫複合体に西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)などの酵素が結合したアビジンを添加しビオチン-アビジン酵素コンプレックスを形成させ、酵素の発色基質や発光基質により目的の抗原を検出する。アビジンにフルオレッセインなどの蛍光物質やアクリジニウムエステルなどの発光物質を導入して目的の抗原を検出することもできる。

30

【0004】

また血清などの生体試料中の抗原を検出する免疫測定法は次のような工程で行う。まずマイクロプレート等の担体に、測定する抗原と結合する捕捉抗体を固相化する。その後、抗体や担体への非特異的な吸着を防ぐために、牛血清アルブミンなどでブロッキングを行う。これに測定する抗原が含まれる試料を加え、捕捉抗体と目的の抗原を結合させる。さらに抗原を認識する抗体などのプローブとビオチンなどのハプテンが結合したプローブ複合体を添加し、捕捉された抗原とプローブ複合体を結合させる。これにより、捕捉抗体-抗原-プローブ複合体の免疫複合体がマイクロプレートなどの担体上に形成される。この免疫複合体のビオチンとHRP標識アビジンを結合させ、HRPの発色基質や発光基質を加え、目的の抗原を測定する。

40

【0005】

上記のように免疫組織化学法や免疫測定法では、抗体などのプローブとビオチンの結合したプローブ複合体が用いられている。(例えば非特許文献1参照)このビオチンの代わりにジニトロフェニル(DNP)、ジゴキシゲニン(DIG)、FITCなどのハプテンを抗体と結合させプローブ複合体とし、これらのハプテンを認識する抗体に酵素を結合さ

50

せ、検出する方法も開発されている。

【0006】

酵素を用いず、ビオチンの代わりにフルオレッセインなどの蛍光基質やアクリジニウムエステルなどの発光基質と抗体を結合させプローブ複合体とし、蛍光や発光により検出する免疫測定法も開発されている。

【0007】

これらの免疫組織化学法や免疫測定法は感度と特異性の高い検出法であるが、生体内には通常の方法では検出することが困難な微量物質も数多く存在する。例えば、ヒトガストリン放出ペプチド前駆体 (p r o G R P) の正常人の血清濃度は14 pg/ml程度であり、癌胎児性抗原 (C E A) や α -フェトプロテインの正常人の血清中濃度である5~20 ng/mlと比較すると1000倍ほどの感度が必要である。また外来抗原であるC型肝炎ウイルス (H C V) は、血中に存在するウイルス量が非常に少ないため、100~1000コピーのウイルスRNAを検出する感度が必要で、蛋白質の濃度ではおよそ0.03~0.3 pg/mlの抗原を検出する感度が必要である。

10

【0008】

生体内の微量物質の検出のため、免疫組織化学法や免疫測定法の感度を上昇させるための改良が行われてきている。免疫組織化学法や免疫測定法の感度の上昇には、様々な要素が関係しているが、上記の抗原と結合する抗体などのプローブとビオチンなどの結合したプローブ複合体の機能を改良することも1つの要素である。例えば、一分子の抗体に結合させるビオチンの分子数を増加させることにより、そのビオチンに結合するアビジン、アビジンに結合した酵素などの分子数が増加し、発色や発光のシグナルが上昇し感度が上昇する。

20

【0009】

しかし、従来の抗体などのプローブとビオチンやハプテンなどが結合したプローブ複合体は、抗体に直接ハプテンを結合させるものである。例えば、抗体にビオチンを結合させる1つの方法は、抗体のアミノ基とビオチンに導入したNHSEステルを反応させ、共有結合により作製するものである。この場合、反応条件の検討により一分子の抗体に結合するビオチンの分子数を増加させることができる。しかし抗体のアミノ基の数は限られており、結合するビオチンの分子数も限界がある。また抗体の抗原決定基の近傍のアミノ基にビオチンが結合した場合は、逆に立体障害などにより抗体と抗原の結合を阻害することも考えられる。

30

【0010】

さらに結合させるハプテンが疎水性の物質である場合は、抗体に多数の疎水性のハプテンが結合すると、プローブ複合体全体としての疎水性が強まる。免疫組織化学法や免疫測定法において、プローブ複合体の疎水性が強いと、組織やプレートへの疎水結合による非特異的な結合が起り、バックグラウンドの上昇につながり十分な感度を得ることができなくなる。

【非特許文献1】 Harlow, E.およびLane, D.著, 「Antibodies: A LABORATORY MANUAL」 (米国), Cold Spring Harbor Laboratory, 1988年, p. 340-341.

【発明の開示】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

従って、本発明の目的は高感度の免疫測定法に用いることのできる高機能のプローブ複合体を提供することであり、かつ可溶性の感度の高いプローブ複合体を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本願発明者らは上記の課題を解決するため、担体に親水性の伸介物質を結合させ、その伸介物質に抗体及びビオチン、ハプテン、放射性同位体または低分子量のペプチドなどの検出マーカーを結合させることにより、高感度なプローブ複合体を作製できることを見出

50

し、本願発明を完成させたものである。担体に親水性の仲介物質を結合させることにより、多くの前述した検出マーカーを結合させ、且つプローブ複合体全体として親水性が増加するため、非特異的な反応を起こしにくく、高機能なプローブ複合体を完成させた。

【発明の効果】

【0013】

本発明のプローブ複合体は生体内に存在する抗原、蛋白質を検出するためにプローブ複合体を改良したものである。このプローブ複合体を用いることにより、従来測定不可能であった抗原や蛋白質が免疫組織化学法や免疫測定法により測定可能となる。

【0014】

さらに仲介物質が親水性であるため、ハプテン、ビオチン、放射性同位体、低分子量ペプチドなどの検出マーカーが疎水性であってもプローブ複合体の親水性が増加し、全体として疎水性が弱まる。そのため免疫反応における疎水結合による非特異反応を軽減させる効果も期待できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明は担体に仲介物質として親水性の物質を結合させ、さらに親水性の物質にプローブとビオチン、ハプテン、放射性同位体、低分子量ペプチド、レクチンなどの検出マーカーを直接結合させるものである。この検出マーカーとは本願発明のプローブ複合体を免疫反応に利用するための標識物である。

【0016】

本発明でいう担体とは、分子量20,000～4,000,000のものであれば特別な制限はない。しかしながら、感度をより向上させるためには、多数の抗体などのプローブやハプテンなどが結合できるように、ある程度以上の分子量をもったものが望ましい。担体の例としては、多糖類や高分子量蛋白質やペプチドポリマーが挙げられ、それらの分子量が20,000～20,000,000、好ましくは20,000～4,000,000、さらに好ましくは70,000～2,000,000のもものが適している。また、多糖類やペプチドポリマーを使用する場合、同じ分子量でも側鎖に富んだもののほうが、より多くの仲介物質を結合させることができる。

【0017】

本発明における多糖類の担体としては、デキストラン、アミノデキストラン、フィコール、デキストリン、アガロース、各種セルロース、キチン、水溶性キトサン、可溶性でんぷんなどが例示される。また、本発明における高分子量蛋白質の担体としては、 β -ガラクトシダーゼ、サイログロブリン、ヘモシアニンなどが例示される。また、本発明におけるペプチドポリマーの担体としては、ポリリジンのほか各種ペプチドポリマーが使用できる。

【0018】

本発明における仲介物質としては、水溶性の分子量2000以上の物質であれば様々なものを使用することができる。例えば、牛血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、トランスフェリン、リボヌクレアーゼ、カゼイン、ヘモグロビン、オボアルブミン、アビジンなどの蛋白質や、水溶性キトサンなどが挙げられる。またポリリジンのようなペプチドポリマーも利用可能である。

【0019】

プローブとしては、抗体（モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体）およびその断片（F(ab')₂、Fab'、Fab、F(abc')、Fabc'など）、各種レセプターなどで、測定しようとする物質結合する蛋白質であればよい。また各種アビジン（アビジンD、ストレプトアビジンなど）、プロテインA、プロテインG、プロテインL、各種レクチン（コンカナバリンA、レンチルレクチン、インゲンマメレクチンなど）、各被分析核酸結合プローブなども使用できる。

【0020】

抗体は、目的とする抗原あるいは被分析物と結合するものであればよい。抗体はペプシ

ンやパブリンといったプロテアーゼを用いて、F (a b') 2やF a bといった断片を得ることができる。一般的に抗体の重鎖 (H鎖) は、S-S結合により重鎖同士が結合しており、その結合は還元剤にて切断される。還元剤としては、システアミンやメルカプトエタノールなどがあげられ、F (a b') 2もこのような還元剤でF a b' に切断されチオール (SH) 基が新たに生じる。本発明には、抗体のこれらの断片 (F (a b') 2、F a b'、F a b、F (a b c')、F a b c' など) も使用することができる。

【0021】

本発明の仲介物質には検出マーカーとしてハプテンや低分子量のペプチド、レクチンなどの免疫反応のシグナルの検出に利用できる物質を結合させることができる。検出マーカーとはプローブ複合体を免疫測定に利用するための標識物である。このような検出マーカーとしては、ビオチンまたはハプテンが考えられる。ハプテンにはジニトロフェニル (DNP)、ジゴキシゲニン (DIG)、FITCなどが含まれる。例えばビオチンをプローブ複合体に結合させた場合、ビオチンに親和性のあるアビジンにHRPのような酵素、フルオレセインのような蛍光物質又はアクリジニウムエステルのような発光物質を標識し、プローブ複合体と反応させ発色、蛍光、発光などによりシグナルを検出することができる。

10

【0022】

またハプテンとしてフルオレセイン・イソチオシアネート (FITC) やアクリニジウムエステルなどの蛍光物質や発光物質を直接仲介物質に結合させることもできる。この場合も蛍光や発光でシグナルを検出できる。

20

【0023】

また、放射性同位体を直接仲介物質に結合させたり、放射性同位体でラベルされたハプテンを仲介物質に結合することもでき、この場合その放射活性でシグナルを検出することができる。

【0024】

さらにハプテンとしてDIGやDNPを結合させることができる。これらの場合は、DIGやDNPに結合する抗体を酵素、蛍光物質、発光物質などで標識したものを反応させシグナルとして検出する。この場合はハプテンに対する抗体が取得できるものであれば、どのような物質でも免疫測定系の検出マーカーとして使用可能である。

30

【0025】

検出マーカーとしてはハプテン以外に低分子量のペプチドなども利用可能である。プローブ複合体の仲介物質に低分子量のペプチドを結合させ、このペプチドに対する抗体に酵素、蛍光物質、発光物質を標識しシグナルを検出することができる。これらのペプチドは糖鎖や脂質を含んでいるものでもかまわない。

【0026】

検出マーカーに対する抗体を用いて免疫反応のシグナルを検出する場合は、検出マーカーは抗体の取得できる抗原性のある物質であり、仲介物質と結合できるものであればハプテンや低分子量ペプチド以外の物質も利用可能である。

【0027】

さらに発光、発色酵素の基質も仲介物質に結合させ検出マーカーとして利用できる。基質に対する酵素を反応させることにより、シグナルを検出することができるからである。

40

【0028】

本願発明のプローブ複合体に結合させる検出マーカーは分子量1万以下のものが望ましい。高分子量の場合は仲介物質に結合できる分子数が制限され免疫測定法の感度の上昇に寄与できないことが考えられるからである。

【0029】

さらに各種レクチン (コンカナバリンA、レンチルレクチン、インゲンマメレクチンなど) なども検出マーカーとして利用可能である。

【0030】

以下に非限定的にプローブ複合体の製造方法を概説する。

50

【0031】

本願発明は、まず担体と仲介物質が結合した複合体を作製する。例えば担体として糖鎖を有するデキストランやフィコールなどと、仲介物質としてBSAやカゼインなどの蛋白質を結合させる場合、まずデキストランやフィコールに過ヨウ素酸ナトリウムを反応させることにより、アルデヒド基が生成される。このアルデヒド基とBSAなどの蛋白質のアミノ基が反応し、担体と仲介物質の複合体が形成される。

【0032】

この複合体は担体単独のものに比べて、親水性が増しており、またプローブおよびハプテン等の結合できる領域も増加している。

【0033】

次に仲介物質にプローブと検出マーカーとしてハプテンを結合させる。プローブとハプテンの結合量をコントロールするため、それぞれの結合に用いる官能基は異なるものを用いることが望ましい。例えば仲介物質BSAにハプテンとしてビオチンを、プローブとしてFab'を結合させる場合は、次のような方法が考えられる。

【0034】

BSAのアミノ基には、ビオチンにNHS (N-hydroxysuccinimide) エステルを導入したSulfo-NHS-LC-BiotinのNHSエステルを結合させる。一方、Fab'とBSAを結合させるため、BSAにリンカーを導入する。BSA内部のS-S結合をシステアミン塩酸やDTTなどで還元し、チオール基を生成させる。このチオール基にリンカーとして1,2-bismaleimideなどを反応させ、マレイミド基を導入する。このマレイミド基と抗体のFabのチオール基を反応させ、担体、仲介物質、検出マーカー、プローブのプローブ複合体を作製することができる。

【0035】

検出マーカーとしては各種ハプテン、放射性同位体やペプチドなどがある。ペプチドを仲介物質に結合させる場合、例えばペプチドの末端にシステインを導入し、このチオール基と仲介物質のBSAなどのアミノ基を利用して結合させることができる。またリンカーを用い、仲介物質にスクシミジル基などを導入し、ペプチドのアミノ基と反応させることもできる。

【0036】

上記の担体と仲介物質の結合、仲介物質と検出マーカーの結合および仲介物質とプローブの結合には共有結合が利用できる。共有結合には様々な官能基を利用できる。例えば、アルデヒド基とアミノ基、ヒドラジン基とアルデヒド基、マレイミド基とチオール基、スクシミジル基とアミノ基、ビニル基とヒドロキシ基、ビニル基とチオール基の共有結合などがあるが、これらの官能基の結合に限られるものではない。また担体、仲介物質、検出マーカー、プローブに結合のための適当な官能基が存在しない場合は、官能基を有するリンカー分子を導入することによって、結合させることができる。

【0037】

リンカーは2種以上の官能基を有しているものであればよいが、2種以上の官能基は異なる官能基でも、同じ官能基でも構わない。

【0038】

作製した担体、仲介物質、プローブおよび検出マーカーとしてハプテンまたは低分子量のペプチドのプローブ複合体は免疫組織化学や免疫測定法などの免疫反応に利用できる。例えば、ビオチンを用いた場合は、目的の抗原とプローブ複合体を結合させた後、アビジン-HRPを反応させ、発色基質または発光基質などを加えて検出することができる。HRPの代わりにアルカリフォスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ルシフェラーゼなどの酵素が結合したアビジンを利用し検出することもできる。

【0039】

またアクリジニウムエステルやその誘導体をプローブ複合体に結合させることもできる。アクリジニウムエステルはNHSエステルを有しているため、BSAなどのアミノ基と反応し結合する。アクリジニウムエステルは化学発光免疫測定に利用可能であり、高感度

10

20

30

40

50

な測定系として利用できる。

【0040】

また検出マーカーとしてDNP、DIG、FITCなどを用いた場合や低分子量のペプチドは共有結合で仲介物質に結合させることができる。そして、これらの物質特異的に結合する抗体にHRPなどの酵素を結合させ、発色や発光で検出することも可能である。

【0041】

本発明をさらに詳しくかつ非限定的に説明するために、以下に酵素プローブ複合体の製造方法およびそれらの性能について実施例を挙げる。

【実施例1】

【0042】

担体としてFicoll 400を用いたビオチン-抗HCVコア抗原モノクローナル抗体複合体の調製

Ficoll 400 (Amersham Biosciences) 44 mgを秤量し、0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.8 mLに溶解し、過ヨウ素酸ナトリウム溶液を0.4 mL添加混合した。室温で2時間反応させた後、ゲルろ過 (Sephadex G 25, Amersham Biosciences) により余剰の過ヨウ素酸ナトリウムを除去し、Bovine Serum Albumin (BSA) 溶液を添加して、室温で3時間反応させ、FicollにBSAを導入した。反応産物の安定化のため、Dimethylamine Borate (DMAB; 生化学工業株式会社) を添加混合して室温で1時間反応させた後、Ficoll上の未反応のアルデヒド基をブロックするためにTris溶液を添加した。室温で1晩反応させた後、ゲルろ過 (Sephacryl S 300, 1.6 * 30) により反応産物を精製し、280 nmの吸光度を測定して担体BSA結合物の濃度を算出した。この担体BSA結合物1 mgをシステアミン塩酸塩で還元し、ゲルろ過 (Sephadex G 25, Amersham Biosciences) により余剰のシステアミン塩酸塩を除去し、Dimethylfolmamideに溶解した1, 2-bismaleimideおよびSulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce # 21335) 水溶液を添加混合し、室温で1.5時間反応させ、担体BSA結合物にマレイミド基およびビオチンを導入した。余剰の1, 2-bismaleimideとSulfo-NHS-LC-Biotinはゲルろ過 (Sephadex G 25, Amersham Biosciences) により除去した。0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 6.0) 中の抗HCVコア抗原モノクローナル抗体のF(ab)'₂溶液 (C11-14 F(ab)'₂とC11-9 F(ab)'₂を等量混合) に、0.15 Mシステアミン塩酸塩を1/10容量添加し、37℃で1.5時間インキュベーションを行い、ゲルろ過 (Sephadex G 25, Amersham Biosciences) により余剰のシステアミン塩酸塩を除去し、抗HCVコア抗原モノクローナル抗体Fab'を得た。このFab'とマレイミドおよびビオチンを導入した担体BSA結合物を混合し、4℃で1晩反応させた後、ゲルろ過 (Sephacryl S 300, 1.6 x 30) を行い、遊離のFab'を除去した。このとき、本発明の担体BSA-Fab'複合体は、ポイド分画近傍に出現し、Sephacryl S 300の排除限界は分子量150万であることから、数十万以上の分子量であることが推測された。このようにして調製された担体BSA-Fab'複合体の280 nmの吸光度を測定し、抗体の吸光度とみなして濃度を算出した。

【実施例2】

【0043】

既存の方法を用いたビオチン化抗HCVコア抗原モノクローナル抗体の調製

Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce # 21335) の添付文書に記載の方法に従って行った。PBS中の抗HCVコア抗原モノクローナル抗体 (C11-14 IgGとC11-9 IgGを等量混合) にSulfo-NHS-LC-Biotinを混合し、室温で1時間反応させた後、余剰のSulfo-NHS-LC-Biotinをゲルろ過 (Sephadex G 25, Amersham Bioscience

s) により除去した。調製したビオチン化抗HCVコア抗原モノクローナル抗体の280nmの吸光度を測定し、抗体濃度を算出した。

【実施例3】

【0044】

実施例1で調製したビオチン-抗HCVコア抗原モノクローナル抗体複合体と実施例2で既存の方法により調製したビオチン化抗HCVコア抗原モノクローナル抗体との比較

抗HCVコア抗原モノクローナル抗体を0.1M酢酸・0.1Mリン酸緩衝液(pH4.8)で4μg/mlに調整し、96穴マイクロプレートの各ウェルに250μlずつ加え、4℃で1晩インキュベーションを行った。PBSで洗浄後、0.5%カゼインを各ウェルに350μlずつ加え、室温で3時間インキュベーションを行った。組み換え体HCVコア抗原(c11)を0fmol/L, 148fmol/L, 444fmol/L, 1333fmol/L, 4000fmol/L, 12000fmol/L, 36000fmol/Lの濃度に調製したものをサンプルとして添加し、攪拌しながら室温で1時間インキュベーションを行った。0.05% Tween20を含む10mMリン酸緩衝液pH7.3(洗浄液)で6回洗浄後、2次抗体として、実施例1で調製したビオチン-抗HCVコア抗原モノクローナル抗体複合体および実施例2で既存の方法により調製したビオチン化抗HCVコア抗原モノクローナル抗体を1μg/mlの濃度に希釈して200μl加え、室温で1時間インキュベーションを行った。洗浄液で6回洗浄し、HRP結合アビジンを5000倍希釈液200μlを1加え、室温で30分間インキュベーションを行った。さらに洗浄液で6回洗浄し、基質溶液(オルトフェニレンジアミン・過酸化水素混合液)を200μl加え、室温で30分間インキュベーションを行い、5N硫酸を50μlずつ加えて反応を停止させた。492nmの吸光度(リファレンス波長600nm)をマイクロプレートリーダー(MPRA4i, TOSOH)で測定した。各濃度の組換え体HCVコア抗原(c11)を加えたウェルの吸光度から0fmol/Lの吸光度の値を差し引いた値を表1に示した。

【0045】

【表1】

表1 コア抗原濃度 既存法によるビオチン化抗体 実施例1のビオチン-抗体複合体

36000 fmol/L	2.083	2.983
12000 fmol/L	0.844	2.353
4000 fmol/L	0.330	1.213
1333 fmol/L	0.107	0.509
444 fmol/L	0.030	0.184
148 fmol/L	0.002	0.052
(0 fmol/Lの値:	0.024	0.017)

【0046】

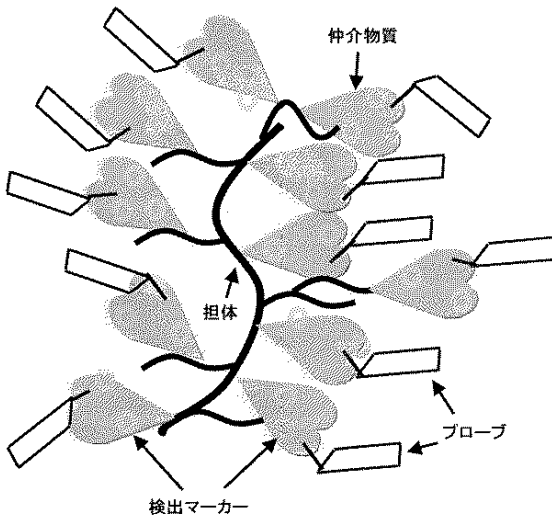
表1より、既存法によりビオチン化した抗体を用いた場合、444fmol/Lのコア抗原量では、0fmol/Lとの差を確認できないが、実施例1で調製した本発明によるビオチン-抗体複合体を用いることにより、444fmol/Lおよびさらに3倍希釈された148fmol/Lのコア抗原量を充分に検出できることは明らかであった。また、吸光度を比較すると、1333fmol/Lで約5倍、444fmol/Lで約6倍ほど本発明のビオチン-抗体複合体が既存の方法よりも高い値を示した。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】 本発明のプローブ複合体の模式図。

【図1】



【手続補正書】

【提出日】平成18年5月29日(2006.5.29)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【書類名】請求の範囲

【請求項1】 水溶性の担体に親水性の分子量2,000以上の仲介物質が結合し、仲介物質にプローブおよび2個以上の検出マーカ^gが結合したプローブ複合体。

【請求項2】 水溶性の担体に親水性の分子量2,000以上の仲介物質が結合し、仲介物質にプローブおよび2個以上の分子量10,000以下の検出マーカ^gが結合したプローブ複合体。

【請求項3】 検出マーカ^gがビオチンである請求項1または2に記載のプローブ複合体。

【請求項4】 検出マーカ^gがハプテンである請求項1または2に記載のプローブ複合体。

【請求項5】 検出マーカ^gが蛍光物質または発光物質である請求項1または2に記載のプローブ複合体。

【請求項6】 検出マーカ^gが放射性同位体を有するものである請求項1または2に記載のプローブ複合体。

【請求項7】 検出マーカ^gが抗体との結合能を有する物質である請求項1または2に記載のプローブ複合体。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2005/013812
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ G01N33/543, 33/53, 33/547		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. ⁷ G01N33/543, 33/53, 33/547		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-13145 A (Nitto Denko Corp.), 19 January, 2001 (19.01.01) (Family: none)	1-5
Y	JP 2002-27990 A (Roche Diagnostics GmbH.), 29 January, 2002 (29.01.02) & EP 696640 A & DE 4428705 A & US 6096319 A	1-5
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 August, 2005 (15.08.05)		Date of mailing of the international search report 30 August, 2005 (30.08.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2005/013812									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ G01N33/543, 33/53, 33/547											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ G01N33/543, 33/53, 33/547											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2005年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2005年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2005年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2005年	日本国実用新案登録公報	1996-2005年	日本国登録実用新案公報	1994-2005年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2005年										
日本国実用新案登録公報	1996-2005年										
日本国登録実用新案公報	1994-2005年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
Y	JP 2001- 13145 A(日東電工株式会社) 2001.01.19 (ファミリーなし)	1-5									
Y	JP 2002- 27990 A(ロッシュ ダイアグノスティックス グーエムペ ーハー)2002.01.29. & EP 696640 A & DE 4428705 A & US 6096319 A	1-5									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 15.08.2005		国際調査報告の発送日 30.8.2005									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 宮澤 浩	2J 9407								
		電話番号 03-3581-1101 内線	3252								

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 青柳 克巳

埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号 株式会社先端生命科学研究所内

(72)発明者 飯田 久美子

埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号 株式会社先端生命科学研究所内

(72)発明者 松原 直子

埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号 株式会社先端生命科学研究所内

(72)発明者 石田 雄彦

埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号 株式会社先端生命科学研究所内

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	探针复杂		
公开(公告)号	JPWO2006011543A1	公开(公告)日	2008-05-01
申请号	JP2006527838	申请日	2005-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社先端生命科学研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社先端生命科学研究所		
[标]发明人	青柳克巳 飯田久美子 松原直子 石田雄彦		
发明人	青柳 克巳 飯田 久美子 松原 直子 石田 雄彦		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54393 G01N33/542		
FI分类号	G01N33/543.525.E G01N33/543.541.B G01N33/53.U		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 Masarushin大崎		
优先权	2004223019 2004-07-30 JP		
其他公开文献	JP4920415B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种可用于高度灵敏的免疫测定中的高功能性和可溶性探针复合物。 解决方案：高灵敏度的探针复合物可以通过将亲水性介质与载体结合，并将抗体和检测标记物（如生物素，半抗原或低分子量肽）与介质结合来制备。 此外，通过将亲水性介质结合到载体上，许多半抗原分子被结合，并且探针复合物整体上变为亲水性，因此不会引起非特异性反应的高性能探针复合物 获得。 [选择图]无

【图 1】

