

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/082681

発行日 平成24年7月12日 (2012.7.12)

(43) 国際公開日 平成22年7月22日 (2010.7.22)

(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 W	4 F 0 7 0
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 U	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/545 B	
CO 8 J 3/12 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 J	
	GO 1 N 33/53 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 17 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2010-546683 (P2010-546683)	(71) 出願人 504171134 国立大学法人 筑波大学 茨城県つくば市天王台一丁目1番1
(21) 国際出願番号 PCT/JP2010/050661	
(22) 国際出願日 平成22年1月14日 (2010.1.14)	
(31) 優先権主張番号 特願2009-7846 (P2009-7846)	(74) 代理人 110000741 特許業務法人小田島特許事務所
(32) 優先日 平成21年1月16日 (2009.1.16)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 長崎 幸夫 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立 大学法人筑波大学内
	(72) 発明者 原 暁非 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立 大学法人筑波大学内
	(72) 発明者 吉本 敬太郎 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立 大学法人筑波大学内

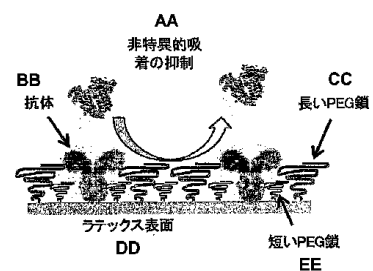
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫ラテックス粒子及びその製造方法

(57) 【要約】

混合ポリエチレングリコールと抗体または抗原がランダムに表面に、それぞれ共有結合を介して共固定された免疫ラテックス粒子が提供される。当該ラテックス粒子は、免疫アッセイに効果的に利用できる。

Fig.1



- AA INHIBITION OF NON-SPECIFIC ADSORPTION
- BB ANTIBODY
- CC LONG PEG CHAIN
- DD SURFACE OF LATEX
- EE SHORT PEG CHAIN

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

混合ポリエチレングリコールと抗体または抗原がランダムに表面に共固定された免疫ラテックス粒子であって、混合ポリエチレングリコールが長鎖ポリエチレングリコール分子群と短鎖ポリエチレングリコール分子群からなり、そして前記共固定が、それぞれラテックス粒子表面上の官能基と混合ポリエチレングリコールおよび抗体または抗原の対応する官能基を介する共有結合の形成により達成される、上記ラテックス粒子。

【請求項 2】

ラテックス粒子がポリスチレンをベースとし、かつ該粒子表面の官能基と混合ポリエチレングリコールおよび抗体の対応する官能基が、それぞれ、カルボキシル基とアミノ基、カルボキシル基とヒドロキシル基、アミノ基とグルタルアルデヒド架橋を介するアミノ基、クロロメチル基とアミノ基、またはアセタール基とアミノ基、アミノ基とカルボキシル基、ヒドロキシル基とカルボキシル基、である、請求項 1 記載のラテックス粒子。

10

【請求項 3】

抗体または抗原が抗体であり、ラテックス粒子表面の官能基がカルボキシル基である、請求項 1 または 2 記載のラテックス粒子。

【請求項 4】

ラテックス粒子表面の官能基が、少なくとも 6×10^{-2} / 官能基以下の間隔で導入されたものであり、該粒子の平均粒径が $50 \text{ nm} \sim 150 \mu\text{m}$ である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のラテックス粒子。

20

【請求項 5】

混合ポリエチレングリコールがポリエチレングリコール部の数平均分子量が $2000 \sim 8000 \text{ g/mol}$ の長鎖ポリエチレングリコール分子群と $1500 \sim 4000 \text{ g/mol}$ の短鎖ポリエチレングリコール分子群からなり、かつ、長鎖ポリエチレングリコール分子群と短鎖ポリエチレングリコール分子群の平均分子量の差が少なくとも 3000 g/mol である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のラテックス粒子。

【請求項 6】

混合ポリエチレングリコールが -メトキシ-ポリ(エチレングリコール)-ペンタエチレンヘキサミンに由来し、ポリ(エチレングリコール)が約 5000 ダルトンの分子量を有するものと約 2000 ダルトンの分子量を有するものを含んで成り、前者と後者が $3 : 5 \sim 2 : 5$ のモル比で存在する、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のラテックス粒子。

30

【請求項 7】

抗体または抗原が抗体であって、抗フェリチン抗体である、請求項 6 記載のラテックス粒子。

【請求項 8】

ラテックス粒子が、AJ26 COOH-Clean (登録商標) である、請求項 7 記載の粒子。

【請求項 9】

請求項 1 記載の免疫ラテックス粒子の製造方法であって、タンパク質のアミノ酸残基のアミノ基またはカルボキシル基と反応できる官能基を表面に有するラテックス粒子と抗体または抗原を、該官能基と該アミノ基またはカルボキシル基が反応して共有結合を形成できる条件下で接触させて該抗体または抗原を該ラテックス粒子に共有結合せしめ、次いで、こうして得られた抗体または抗原が共有結合したラテックス粒子と一末端にアミノ基またはカルボキシル基を有する混合ポリエチレングリコールを前記条件下で接触させて該混合ポリエチレングリコールを該ラテックス粒子にさらに共有結合せしめる工程を含んでなり、かつ、混合ポリエチレングリコールが長鎖ポリエチレングリコール分子群と短鎖ポリエチレングリコール分子群からなる、上記ラテックス粒子の製造方法。

40

【請求項 10】

被検体を含むサンプル中に請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載のラテックス粒子を存在させるステップ、

50

被検体とラテックス粒子に固定された抗体または抗原が結合し得る条件下でラテックス粒子が存在する被検体を含有するサンプルをインキュベートして、ラテックス粒子を凝集させるステップ、および

ラテックス粒子の凝集の程度を被検体が存在する尺度として評価するステップを含んで成る、被検体の検出方法。

【請求項 11】

被検体がフェリチンであり、抗体が抗フェリチン抗体である、請求項 10 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、混合ポリエチレングリコールと抗体が共固定化された表面を所有する免疫ラテックス粒子及びその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

適当な抗体（または抗原）で被覆したラテックス粒子は生物学的流体における多種多様な生体分子の定量に関する研究及び診断法で広範囲にわたって利用されてきた（例えば、非特許文献 1 参照）。このようなラテックス粒子が良好な分析感度を示す抗原抗体反応の向上した免疫アッセイの適用範囲を拡大してきた。また、ラテックス粒子の抗原または抗体の被覆は物理的吸着を利用するよりラテックス粒子への抗原または抗体の共有結合が、形成されたタンパク質担持粒子を経時的により安定にすることから、物理的吸着に比べて分析性能を向上することが知られている。このような観点からタンパク質のアミノ酸残基と共有結合できる官能基としてアミノ基、クロロメチル基またはアセタール基を表面官能基として有するラテックス粒子が、該官能基を介して、例えば、抗フェリチン抗体を共有結合せしめ、血清フェリチンの定量に必要な高感度を達成するために提案されている（例えば、非特許文献 2）。

このような免疫診断用の一種であるラテックス / 抗体複合体は、抗体 - 抗原の相互作用により迅速に凝集し、抗原の存在を示す比濁アッセイ（*turbidimetric or nephelometric assay*）に使用できる。したがって、抗原以外の因子とラテックス / 抗体複合体による、所謂、非特異凝集を避けることが非常に重要である。このような抗体結合ラテックス粒子はそのまま対応する抗原を検出するのに使用できるが、使用条件、例えば、測定対象サンプルが血清等である場合、被検体抗原と共存する他の血清タンパク質等により非特異凝集が起こる場合がある。このような非特異反応を、ブロックするためにブロッキング剤として牛血清アルブミン（BSA）がラテックス / 抗体複合体粒子作製に利用されている。

また、上記のような非特異凝集が生じるのを防ぐために、本発明者の一部を含む発明者等は、ラテックス粒子を形成する際に、該粒子を形成するためのモノマーとともに、さらなるモノマーとして、鎖長の異なる 2 種のポリエチレングリコール鎖を有するマクロマーを、水性媒体中で乳化重合せしめて、ラテックス粒子表面が水性媒体中で可動性のポリエチレングリコール鎖で被覆され得るラテックス粒子を提案した（特許文献 1）。この粒子では、該ポリエチレングリコールの非重合性末端に存在する官能基を介して抗体等の生体分子と特異的に結合し得る分子を固定することが企図されている。そして、かような抗体分子は該ポリエチレングリコール鎖の末端に存在するので、可動性のポリエチレングリコール鎖に覆われることなく裸の状態で存在することが予測されることから、該抗体本来の活性を奏し易いこと、一方、ラテックス粒子表面を覆うポリエチレングリコール鎖が該粒子への抗原以外の測定サンプル中に存在するタンパク質等の非特異結合を防止できることが示唆されている。

なお、ラテックス粒子表面でないが、金、半導体または磁性体の表面における上記の如き非特異結合を防止するものとして、該表面へ混合ポリエチレングリコールを物理的または化学的に結合せしめた生体分子の測定用チップが提案されている。また、本発明者の一部を含む発明者等も、金粒子表面、半導体ナノ粒子表面、磁性体粒子表面、シリカ粒子表

10

20

30

40

50

面、およびこれらの粒子のいずれか一種を含むラテックス粒子表面に混合ポリエチレングリコールを物理結合または化学結合を介して非共有結合的結合せしめた粒子も提案した（特許文献2）。さらにカルボキシル活性化磁性粒子の表面に混合ポリエチレングリコールを共有結合せしめた抗体/混合ポリエチレングリコールの共固定された粒子も提供されている（非特許文献3）。

しかしながら、前者のブロッキング剤として牛血清アルブミンを使用する系では、ラテックス/抗体複合体の分散安定性や免疫診断能力（信号/ノイズ比）が必ずしも十分ではなく、さらなる改善の余地がある。一方、後者のポリエチレングリコールマクロマーに由来する単位をラテックス粒子中に組み込む系では、夾雑タンパク質等の非特異結合が低減された、物理的に安定な免疫ラテックス粒子が提供できるものの、それらの作製が必ずしも容易でないし、ラテックス粒子表面に結合せしめる抗体または抗原の種類によっては、それらを介する特異的結合能が低下することもしばしば起こる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】WO2004/056895

【特許文献2】WO2005/010529

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Peula-Garcia et al., J. Colloid Interface Sci. 245 (2002), 230

【非特許文献2】Izquierdo et al., J. of Immunological Methods 287 (2004), 159-167

【非特許文献3】: Nagasaki et al., J. Colloid and Interface science 309 (2007), 524-530

【発明の概要】

【0005】

上述したように、特許文献1に開示された混合ポリエチレングリコール鎖を有するマクロマーを用いて作製したラテックス粒子は、さらに抗体等の生体分子と特異結合する分子を安定に固定した免疫粒子を提供できるものの、十分な密度に抗体分子等を担持させることが必ずしも容易ではないことが判明した。また、ブロッキング剤としてBSAを使用するラテックス粒子の系では、BSA自体のタンパク質の特徴に起因してブロッキング効果と粒子を水性媒体中に分散させる効果が制限される場合がある。

したがって、本発明では、粒子の分散性を高度に向上させ、粒子間の様々な非特異的相互作用を極限まで低下させるとともに、抗原との反応性を向上させ、しかも高感度・高性能な免疫診断ラテックス粒子を提供することを目的とする。

このような目的を達成すべく、新規なラテックスを作製し、それらの特性について検討してきたところ、上記非特許文献3に記載された表面の修飾された磁性粒子に比べてよりフレキシブルな構造を有することが予測されるラテックス粒子でも、生体分子と特異的に結合する分子、抗体または抗原等と混合ポリエチレングリコールを該粒子表面へ効果的に共固定できることがここに見出された。

さらに、理論に拘束されるものでないが、抗体または抗原等と混合ポリエチレングリコールを該粒子表面に共固定した場合には、抗体または抗原、特に、タンパク質性の抗原、例えば、抗体はポリエチレングリコール鎖によりランダムに取り囲まれることが予測されるにもかかわらず、上記特許文献2の金粒子等の表面に固定されたポリエチレングリコール鎖の非固定末端に結合し、裸の状態にあることが予測される抗体に比べて、勝るとも劣らない抗体の結合特性を示すことが確認された。さらに、驚くべきことに、ラテックス粒子表面に混合ポリエチレングリコールとともに共有結合を介して共固定された抗体は、通常遊離の状態または混合ポリエチレングリコールと共固定されていない状態にある抗体に比べて熱安定性、高塩濃度に対する抵抗性等が高まる一方で、抗体が本来有している抗原

10

20

30

40

50

への結合特性を依然として高度に保持している、ことも確認された。

こうして、本発明によれば、混合ポリエチレングリコールと抗体または抗原がランダムに表面に共固定された免疫ラテックス粒子が提供される。該ラテックス粒子における、混合ポリエチレングリコールは長鎖ポリエチレングリコール分子群と短鎖ポリエチレングリコール分子群からなり、そして前記共固定が、それぞれラテックス粒子表面上の官能基と混合ポリエチレングリコールおよび抗体または抗原の対応する官能基を介する共有結合の形成により達成される。

また、別の態様の本発明として、上記免疫ラテックス粒子の製造方法であって、タンパク質のアミノ酸残基のアミノ基またはカルボキシル基と反応できる官能基を表面に有するラテックス粒子と抗体または抗原を、該官能基と該アミノ基またはカルボキシル基が反応して共有結合を形成できる条件下で接触させて該抗体または抗原を該ラテックス粒子に共有結合せしめ、次いで、こうして得られた抗体または抗原が共有結合したラテックス粒子と一末端にアミノ基またはカルボキシル基を有する混合ポリエチレングリコールを前記条件下で接触させて該混合ポリエチレングリコールを該ラテックス粒子にさらに共有結合せしめる工程を含んでなる上記ラテックス粒子の製造方法も提供される。

さらに別の態様の本発明として、上記ラテックス粒子を用いる被検体（ラテックス粒子に固定された抗体または抗原に特異的に結合しうる分子、構造物、例えば、細胞若しくは細胞破砕物等）の検出方法も提供される。各要素については後述するものもあるが、具体的には、被検体を含むサンプル中に上記ラテックス粒子を存在させるステップ、被検体とラテックス粒子に固定された抗体または抗原が結合し得る条件下（通常、20～30の間）でラテックス粒子が存在する被検体を含むサンプルをインキュベート（通常、30秒～10分）して、ラテックス粒子を凝集させるステップ、およびラテックス粒子の凝集の程度を被検体が存在する尺度として評価するステップを含んで成る、被検体の検出方法が提供される。凝集の程度は、目視、もしくは、一般的な分光器、さらには一部臨床現場に存在する分光検出を原理とする自動測定装置などにより、評価すればよい。

発明の詳細な記述

以下、本発明で使用する技術用語または技術内容についてより具体的に説明する。本発明または本明細書で使用する用語は特記しない限り、当該技術分野で普通に用いられている意味内容を表示するものとして理解されねばならない。

ラテックス粒子は、コロイド状に水中に分散した乳濁液を形成する微粒子であって、免疫凝集アッセイで用いることのできる粒子を意味し、上記の本発明の目的に沿うものである限り、使用モノマーの種類、製造方法により制限されることなく使用できる。限定されるものでないが、使用モノマーとしては、スチレン、スチレン-ブタジエンおよびアクリロニトリル-ブタジエン等、並びにこれらのモノマーの誘導体由来する合成ゴムラテックスを形成できるモノマー、さらには、アクリル系、酢酸ビニル系、および塩化ビニル系等、並びにこれらのモノマーの誘導体由来する、所謂、樹脂ラテックスからなる群より選ばれるモノマーの混合系またはそれらの一種以上のモノマーの組合せ物を用いて、乳化重合法により製造される粒子が本発明で用いことのできるラテックス粒子が包含される。これらのうち、スチレンをベースとするものが好ましく用いられる。スチレンをベースとするとは、スチレンまたはその誘導体（例えば、クロロメチルスチレン、ジビニルベンゼン）に由来する単位が、総粒子重量当り少なくとも50%以上占めることを意味する。

該ラテックス粒子表面の官能基は、上記に挙げたモノマーと、相当する官能基、例えば、カルボキシル基、アミノ基、クロロメチル基、アセタール基を有するモノマー、例えば、アクリル酸、メタクリル酸、アミノエチルメタクリレート、クロロメチルスチレン、アクロレインジエチルアセタール等を共重合させることにより導入し、必要があれば、かような官能基を粒子の形成後に別の官能基に転換せしめて担持させることもできる。このようなラテックス表面上の官能基と、該表面に共固定する混合ポリエチレングリコール（以下、ポリエチレングリコールをPEGと略称する場合がある）の一末端に有する官能基および抗体もしくはタンパク質性抗原のアミノ酸残基の官能基との共有結合の形成は、それ

10

20

30

40

50

それ、例えば、カルボキシル基とアミノ基、カルボキシル基とヒドロキシル基、アミノ基とグルタルアルデヒド架橋を介するアミノ基、クロロメチル基とアミノ基、またはアセタール基（アセタールの酸加水分解を介するアルデヒド基もしくはホルミル基）とアミノ基、アミノ基とカルボキシル基、ヒドロキシル基とカルボキシル基との組み合わせにより形成できる。かような組み合わせによる共有結合の形成に先立ち、必要があれば、ラテックス粒子表面上の官能基をそれ自体当該技術分野で周知の活性化反応に供してもよい。

これらの組み合わせの使用の最適条件は、固定されるPEG末端の官能基の特性により変動するが、例えば、正電荷を有するポリアミンを末端官能基に有するPEGの場合には、ラテックス粒子表面の官能基がマイナス電荷を有するカルボキシル基となるように選択するのがよい。また、PEGのもう一方の末端は、PEGとラテックス表面のそれぞれの官能基の共有結合形成反応に悪影響を及ぼさないヒドロキシル基または置換されていてもよいC₁-C₆アルコキシ基で末端が形成されていてもよい。C₁-C₆アルコキシ基が置換されている場合の置換基はアセタール部分、ヒドロキシル基、モノもしくはジC₁-C₆アルキル置換アミノ基、ハロゲン原子等であることができる。

ラテックス粒子は、該粒子表面の官能基が、限定されるものでないが、少なくとも63²/官能基以下の間隔で導入されたものであり、該粒子の平均粒径が50nm~150μm、好ましくは100nm~800nm、より好ましくは100nm~500nmであるものが有利に使用できる。また、このような基準を参考に、市販のラテックス粒子、例えば、Ikerlat (Spain)社製のAJ26 COOH-Cleanを用いることもできる。

該ラテックス粒子表面に共固定させる混合ポリエチレングリコールは、ポリエチレングリコール部の数平均分子量が2000~8000g/molの長鎖ポリエチレングリコール分子群と1500~4000g/molの短鎖ポリエチレングリコール分子群からなり、かつ、長鎖ポリエチレングリコール分子群と短鎖ポリエチレングリコール分子群の平均分子量の差が少なくとも3000g/molである、ポリエチレングリコール誘導体、ラテックス粒子との反応末端に好ましくはポリアミンが導入されたPEGが有利に使用できる。一方、該粒子表面に共固定される抗体または抗原は、モノクローナルもしくはポリクローナル抗体を使用するのが、抗体分子の反応特性または安定性の観点から好ましい。限定されるものでないが、等電点は中性~塩基性(7以上)を有する抗体に分類できる抗体が好ましく使用できる。

混合ポリエチレングリコールの長鎖ポリエチレングリコール分子群と短鎖ポリエチレングリコール分子群がモル比(仕込時)で、1:5~5:1、好ましくは3:5~2:5で存在する。ポリエチレングリコール分子群と共固定される抗体の量は、条件により好適な量は変動するが、一般的に350から1200個/ラテックス粒子、程度である。(これらは、作製した粒子の分散安定性および反応活性の変化を観測することにより確認することができる。)

上記の免疫ラテックス粒子は、いかなる方法によって製造方法したものであってもよい。しかし、都合よくは、抗体を構成するタンパク質のアミノ酸残基のアミノ基またはカルボキシル基と反応できる官能基を表面に有する上記ラテックス粒子と、抗体または抗原を、該官能基と該アミノ基またはカルボキシル基が反応して共有結合を形成できる条件下、必要があれば、常法によりカルボキシル基を活性エステル化した後、抗体または抗原の結合活性に悪影響を及ぼさない条件下、で相互に接触させて該抗体または抗原を該ラテックス粒子に共有結合せしめ、次いで、こうして得られた抗体または抗原が共有結合したラテックス粒子と一末端にアミノ基またはカルボキシル基を有する混合ポリエチレングリコールの長鎖ポリエチレングリコール分子群を前記条件下で接触させた後、短鎖ポリエチレングリコール分子群を前記条件下で接触させて、該混合ポリエチレングリコールを該ラテックス粒子にさらに共有結合せしめる工程を含んでなるラテックス粒子の製造方法により取得できる。当業者であれば、上記の条件は、後述する実施例を参考に、必要により適宜改変した条件を設定することができるであろう。

本発明の免疫ラテックス粒子は、限定されるものでないが、被検体として生体分子を含

10

20

30

40

50

む可能性のある生物学的流体、例えば、血液、唾液、尿、髄液、細胞、細胞破砕物、等のサンプル中の被検体を、夾雑タンパク質等に悪影響を受けることなく、検出または定量できる。加えて、該粒子に固定された抗体が本来有利の状態できる温度、一般に、室温（約25）を数十度越えた温度でも安定に使用できるとの効果を奏する。本発明の免疫ラテックス粒子は、さらに、前記流体が生体に由来するものより、さらに高塩濃度であっても、抗体の特性を失うことなく、使用できる。

理論により拘束されるものでないが、当該粒子の表面の概念図の略図を示す図1から理解できるように、短鎖ポリエチレングリコール鎖と長鎖ポリエチレングリコール鎖とが密に抗体を取り囲むことにより、該抗体分子の方向性が規制されるために抗体本来の特異的結合性を保持したまま、一方では、高温または高塩濃度等の外的環境の影響を低減できるものと理解できる。

また、限定されるものでないが、該免疫ラテックス粒子に抗体として抗フェリチン抗体を担持せしめると、特有の構造（例えば、鉄を含む分子量46万のタンパク質）を有するフェリチンですら、極めて高感度（10 - 100 ng/ml）で選択的に検出することができる。これは、水性媒体中で高い可動性を示し、血清タンパク質等を排斥することが知られているポリエチレングリコールが密に抗フェリチン抗体を取り囲んでいることが予測されることを考慮すると、驚くべきことである。

【図面の簡単な説明】

【0006】

図1は本発明の免疫ラテックス粒子表面の概念図の略図である。

図2は実施例2に係る、LAMP複合体（図2のaおよびb中、それぞれ、黒塗り四角または白抜き四角）およびLAP複合体（図2のaおよびb中、それぞれ黒塗り三角および白抜き三角）の濃度の変動するフェリチンとの結合の結果を示すグラフ表示である。

図3は実施例3に係る、リン酸緩衝液中でフェリチンを測定した結果を示すグラフ表示である。

図4は実施例3に係る、牛胎児血清（FBS）中でフェリチンを測定した結果を示すグラフ表示である。

【発明を実施するための形態】

【0007】

以下、本発明の実施の形態について、詳細に説明する。

【実施例1】

【0008】

免疫ラテックス粒子の作製：

表面にカルボキシル基を有するラテックス粒子（Bio kit S.A.社製、AJ26 COOH-Clean（登録商標）；30μl；10% w/v）と167μlのNaH₂PO₄水溶液（10mM，pH=4.8）を混ぜた後、1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド塩酸（EDC、3μl、12.5mg/ml、EDCと粒子表面のカルボキシル基のモル比=1:1）の活性エステルの水溶液を加え、25で20分間攪拌（攪拌速度：1000rpm）させることでラテックス粒子の表面のカルボキシル基を活性化した。こうして得られた混合溶液を100μlのリン酸緩衝液（10mM，pH=7.4）で希釈した後、混合溶液から50μlを分取後、これに対して275μlのリン酸緩衝液（10mM，pH=7.4）と10μlの抗体溶液（anti-ferritin（Bio kit S.A.社から入手）、0.516 - 1.71mg/ml，pH=7.4）を添加し、25で60分間攪拌せる（攪拌速度=1000rpm）ことで、抗体に有するアミノ官能基と活性化した粒子表面のカルボキシル基と反応させ、抗体をラテックス粒子の表面に固定した。このようにして作製したラテックス/抗体（以下、LAと略記する場合あり）複合体を300μl取り、-メトキシ-ポリ（エチレングリコール）-ペンタエチレンヘキサミン（N6-PEG-5k、0.3% w/v、pH=7.4）を含むリン酸緩衝液150μlを加え、25で30分間攪拌（攪拌速度=1000rpm）することでN6-PEG-5kを粒子表面上に固定化し（末端のA

10

20

30

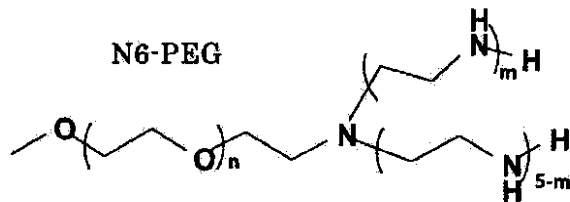
40

50

ミノ基と活性化した粒子表面のカルボキシル基との反応)、ラテックス/抗体/PEGの複合体(以下、LAPと略記する場合あり)が得られた。また別に、300 μ lのLA複合体を75 μ lのN6-PEG-5k(0.6% w/v、pH=7.4)に入れて同様に反応させた後、更に鎖長の短いPEG、N6-PEG-2k(0.4% w/v、pH=7.4、5k/2k=1:0.67)を入れて同様に反応させることで、ラテックス/抗体/混合PEG鎖の複合体(以下、LAMPと略記する場合あり)が得られた。ラテックス粒子の最終濃度は0.1% w/vであった。

BSAをブロッキング剤として用いたLAB(latex/antibody/BSA)複合体は、上記LAPの作製法と同じで、単にN6-PEG-5kの代わりにBSA(0.04% w/v、pH=7.4)を使用することで得た。

10



【実施例2】

【0009】

長鎖PEG修飾粒子と混合PEG修飾粒子のフェリチン検出能の評価と比較：

20

実施例1にて作製した粒子のうち、0.516mg/mlの抗体濃度とN6-PEG-5kのみを用いて作製した粒子(LAP)と、0.516mg/mlの抗体濃度と長鎖のN6-PEG-5kおよび短鎖のN6-PEG-2kを用いて作製した粒子(LAMP)の、リン酸バッファー水溶液(PB)中と血清(FBS)中におけるフェリチン応答能を調査した(結果を図2に示す)。この検討に先立ち、PEG鎖を表面に修飾していない抗体固定化ラテックス粒子の粒子分散性を検討したところ、PB中における分散状態を維持することができず、抗原添加に伴う優位な凝集応答は示さなかった。これに対し、上述したLAPとLAMPは、バッファー水溶液中および血清中において高い分散安定性を示すと同時に、10-100ng/mlのフェリチン溶液を添加した際に、直線性のある非常に高い抗原応答能を示すことがあきらかとなった。また、PBならびにFBS中において、LAMP複合体はLAP複合体よりも高いフェリチン検出能を有することわかる(図2のaおよびb参照)。

30

以上の結果は、長鎖PEG単独を修飾するよりも、長鎖/短鎖の混合PEGを粒子表面に修飾したほうが高感度な検出能を有するラテックス粒子が作製可能であることを示す。

【実施例3】

【0010】

抗体固定化量を変化させて作製したラテックス粒子のフェリチン検出能の評価と比較：

実施例1にて作製した粒子、0.516mg/ml、1.13mg/ml、1.71mg/mlの抗体濃度と長鎖のN6-PEG-5kおよび短鎖のN6-PEG-2kを用いて作製した粒子(LAMP0.45、LAMP1.0、LAMP1.5、)のPB中におけるフェリチン検出能を評価した(結果を図3aに示す)。結果として、抗フェリチン抗体を最も多く固定化した粒子(抗体濃度1.71mg/mlを用いて作製)が最も高いフェリチン検出能を示すことが明らかとなった。

40

コントロールとして、従来ブロッキング剤として汎用されている牛血清アルブミンを用いて抗体固定化ラテックス粒子を作製し、その検出能をLAMPと比較した。実施例1に記載した同様の操作により、0.516mg/ml、1.13mg/ml、1.71mg/mlの抗体濃度を用いて作製したラテックス/抗体(以下、LAと略記する場合あり)複合体を300 μ l取り、BSA(0.04% w/v、pH=7.4)を含むリン酸緩衝液150 μ lを加え、25℃で30分間攪拌(攪拌速度=1000rpm)することでBSAを粒子表面上に固定化し(BSAのアミノ基と活性化した粒子表面のカルボキシル

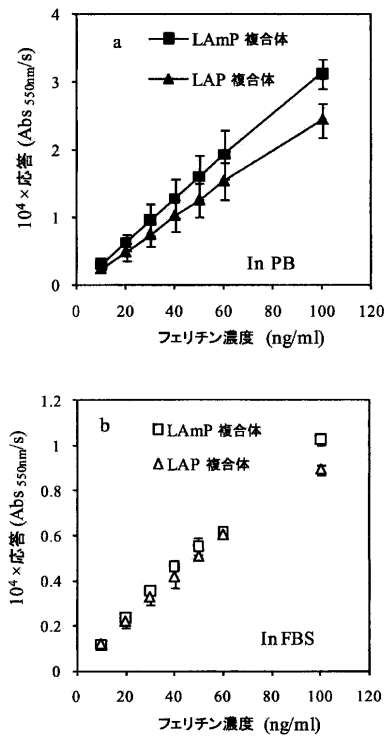
50

基との反応)、ラテックス/抗体/BSAの複合体(以下、LABと略記する場合あり)が得られた。LABのPB中におけるフェリチン検出能を評価したところ、抗フェリチン抗体を最も多く固定化した粒子(抗体濃度1.71mg/mlを用いて作製)が最も高いフェリチン検出能を示すことが明らかとなった。

LAmPとLABを比較した場合、混合PEGをブロッキング剤として修飾したLAmPの方が高いフェリチン検出能を有することがわかる(図3のa, b参照)。特に、FBS中にて同様の評価、比較を行ったところ、LAB粒子は固定した抗体の量にかかわらず反応活性がほぼ観察されないことに対して(図4d)、LAmP粒子は高いフェリチン検出能を示した(図4c)。

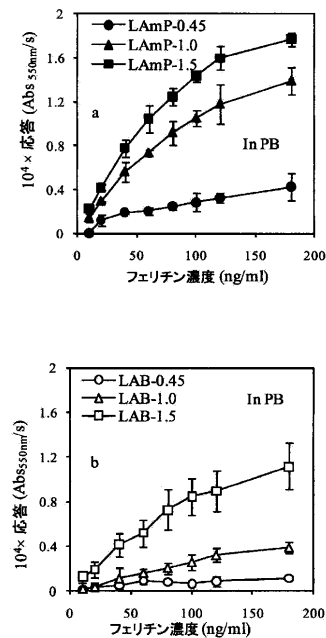
【図2】

Fig.2



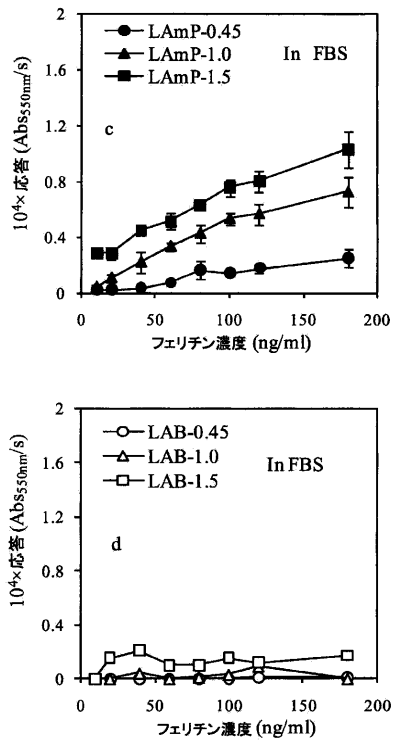
【図3】

Fig.3



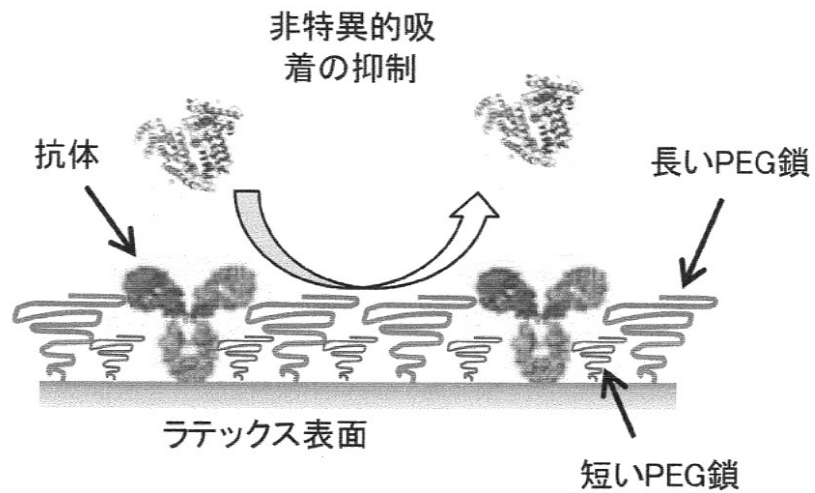
【 図 4 】

Fig.4



【 図 1 】

Fig.1



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成22年11月9日 (2010.11.9)

【 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】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

混合ポリエチレングリコールと抗体がランダムに表面に共固定された免疫ラテックス粒子であって、混合ポリエチレングリコールが長鎖ポリエチレングリコール分子群と短鎖ポリエチレングリコール分子群からなり、そして前記共固定が、それぞれラテックス粒子表面上の官能基と混合ポリエチレングリコールおよび抗体の対応する官能基を介する共有結合の形成により達成され、前記、ラテックス粒子がポリスチレンをベースとし、表面上の官能基がカルボキシル基であり、かつ該粒子表面の官能基と混合ポリエチレングリコールおよび抗体の対応する官能基が、それぞれ、アミノ基である、上記ラテックス粒子。

【請求項2】

(削除)

【請求項3】

(削除)

【請求項4】

ラテックス粒子表面の官能基が、少なくとも 6×10^{-2} /官能基以下の間隔で導入されたものであり、該粒子の平均粒径が $50 \text{ nm} \sim 150 \text{ }\mu\text{m}$ である、請求項1に記載のラテックス粒子。

【請求項5】

混合ポリエチレングリコールがポリエチレングリコール部の数平均分子量が $2000 \sim 8000 \text{ g/mol}$ の長鎖ポリエチレングリコール分子群と $1500 \sim 4000 \text{ g/mol}$ の短鎖ポリエチレングリコール分子群からなり、かつ、長鎖ポリエチレングリコール分子群と短鎖ポリエチレングリコール分子群の平均分子量の差が少なくとも 3000 g/mol である、請求項1または4に記載のラテックス粒子。

【請求項6】

混合ポリエチレングリコールが -メトキシ-ポリ(エチレングリコール)-ペンタエチレンヘキサミンに由来し、ポリ(エチレングリコール)が約 5000 ダルトンの分子量を有するものと約 2000 ダルトンの分子量を有するものを含んで成り、前者と後者が $3:5 \sim 2:5$ のモル比で存在する、請求項1または4に記載のラテックス粒子。

【請求項7】

抗体または抗原が抗体であって、抗フェリチン抗体である、請求項6に記載のラテックス粒子。

【請求項8】

ラテックス粒子が、AJ26 COOH-Clean (登録商標) である、請求項7に記載の粒子。

【請求項9】

請求項1に記載の免疫ラテックス粒子の製造方法であって、タンパク質のアミノ酸残基のアミノ基と反応できる官能基を表面に有するラテックス粒子と抗体を、該官能基と該アミノ基が反応して共有結合を形成できる条件下で接触させて該抗体を該ラテックス粒子に共有結合せしめ、次いで、こうして得られた抗体が共有結合したラテックス粒子と一末端にアミノ基を有する混合ポリエチレングリコールを前記条件下で接触させて該混合ポリエチレングリコールを該ラテックス粒子にさらに共有結合せしめる工程を含んでなり、ここで、混合ポリエチレングリコールが、まず、長鎖ポリエチレングリコール分子群をラテックス粒子の官能基と接触させることにより共有結合を形成し、次いで、短鎖ポリエチレングリコール分子群をラテックス粒子の官能基と接触させることにより共有結合を形成することにより、ラテックス粒子上に抗体と共固定される、上記ラテックス粒子の製造方法。

【請求項10】

被検体を含むサンプル中に請求項1および4～8のいずれかに記載のラテックス粒子を存在させるステップ、

被検体とラテックス粒子に固定された抗体が結合し得る条件下でラテックス粒子が存在

する被検体を含有するサンプルをインキュベートして、ラテックス粒子を凝集させるステップ、および

ラテックス粒子の凝集の程度を被検体が存在する尺度として評価するステップを含んで成る、被検体の検出方法。

【請求項 11】

被検体がフェリチンであり、抗体が抗フェリチン抗体である、請求項 10 記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2010/050661
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/543(2006.01)i, C08J3/12(2006.01)i, G01N33/545(2006.01)i 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) G01N33/543, C08J3/12, G01N33/545 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 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010 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 10-239316 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 11 September 1998 (11.09.1998), paragraph [0042] (Family: none)	1-11
Y	JP 2006-308307 A (Toyo Kohan Co., Ltd.), 09 November 2006 (09.11.2006), claims 1, 3 (Family: none)	1-11
Y	JP 2006-177914 A (Yukio NAGASAKI), 06 July 2006 (06.07.2006), abstract (Family: none)	1-11
<input checked="" 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 04 February, 2010 (04.02.10)		Date of mailing of the international search report 16 February, 2010 (16.02.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/050661

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-190946 A (Kyushu Institute of Technology), 21 August 2008 (21.08.2008), paragraph [0007] (Family: none)	6
Y	JP 2002-48796 A (Kabushiki Kaisha Shima Kenkyusho), 15 February 2002 (15.02.2002), abstract; paragraph [0021] (Family: none)	7, 11
Y	JP 10-114832 A (Boehringer Mannheim GmbH), 06 May 1998 (06.05.1998), claims 1, 6 & US 5932296 A & EP 806250 A2 & DE 19618926 A	1-11
Y	JP 5-34346 A (Tosoh Corp.), 09 February 1993 (09.02.1993), example 5 & US 5434088 A & EP 476545 A1 & DE 69125992 C	1-11
A	JP 2002-40027 A (Yakult Honsha Co., Ltd.), 06 February 2002 (06.02.2002), table 2 (Family: none)	1-11
A	JP 2007-127630 A (Canon Inc.), 24 May 2007 (24.05.2007), abstract & US 2009/0148346 A & WO 2007/043498 A1	1-11
A	WO 2007/063616 A1 (Nihon University), 07 June 2007 (07.06.2007), claim 3; paragraphs [0015], [0031] & US 2009/0047685 A1 & EP 1956372 A1	1-11

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2010/050661									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, C08J3/12(2006.01)i, G01N33/545(2006.01)i											
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. G01N33/543, C08J3/12, G01N33/545											
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>1971-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2010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	1971-2010年	日本国実用新案登録公報	1996-2010年	日本国登録実用新案公報	1994-2010年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2010年										
日本国実用新案登録公報	1996-2010年										
日本国登録実用新案公報	1994-2010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 請求項の番号									
Y	JP 10-239316 A (積水化学工業株式会社) 1998.09.11, 【0042】 (ファミリーなし)	1-11									
Y	JP 2006-308307 A (東洋鋼板株式会社) 2006.11.09, 【請求項1】【請 求項3】 (ファミリーなし)	1-11									
Y	JP 2006-177914 A (長崎 幸夫) 2006.07.06, 【要約】 (ファミリ ーなし)	1-11									
<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		の日の後に公表された文献									
「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		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「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		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「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)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「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 04.02.2010		国際調査報告の発送日 16.02.2010									
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) 三木 隆	2J 3312								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 0 / 0 5 0 6 6 1
C (続き) . 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 請求項の番号
Y	JP 2008-190946 A (国立大学法人九州工業大学) 2008.08.21, 【0007】 (ファミリーなし)	6
Y	JP 2002-48796 A (株式会社シマ研究所) 2002.02.15, 【要約】【0021】 (ファミリーなし)	7, 11
Y	JP 10-114832 A (ベーリンガー マンハイム ゲーエムペーハー) 1998.05.06, 【請求項1】【請求項6】 & US 5932296 A & EP 806250 A2 & DE 19618926 A	1-11
Y	JP 5-34346 A (東ソー株式会社) 1993.02.09, (実施例5) & US 5434088 A & EP 476545 A1 & DE 69125992 C	1-11
A	JP 2002-40027 A (株式会社ヤクルト本社) 2002.02.06, 表2 (ファミリーなし)	1-11
A	JP 2007-127630 A (キャノン株式会社) 2007.05.24, 【要約】 & US 2009/0148346 A & WO 2007/043498 A1	1-11
A	WO 2007/063616 A1 (学校法人日本大学) 2007.06.07, 【請求項3】【0015】【0031】 & US 2009/0047685 A1 & EP 1956372 A1	1-11

フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

C 0 8 J 3/12 C E T Z

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

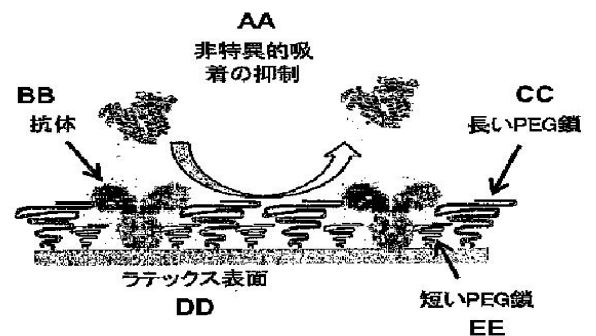
Fターム(参考) 4F070 AA52 AA62 AB03 AE30 DA28 DC16

(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)	Immunolatex颗粒及其制备方法		
公开(公告)号	JPWO2010082681A1	公开(公告)日	2012-07-12
申请号	JP2010546683	申请日	2010-01-14
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人筑波		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人筑波		
[标]发明人	長崎幸夫 原晓非 吉本敬太郎		
发明人	長崎 幸夫 原 晓非 吉本 敬太郎		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/545 G01N33/53 C08J3/12		
CPC分类号	C08J3/26		
FI分类号	G01N33/543.525.W G01N33/543.525.U G01N33/545.B G01N33/543.581.J G01N33/53.D C08J3/12.CET.Z		
F-TERM分类号	4F070/AA52 4F070/AA62 4F070/AB03 4F070/AE30 4F070/DA28 4F070/DC16		
优先权	2009007846 2009-01-16 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

免疫胶乳颗粒包含混合的聚乙二醇和抗体或抗原，它们通过共价键无规共固定在其表面上。胶乳颗粒可有效地用于免疫测定。



**INHIBITION OF NON-SPECIFIC ADSORPTION
ANTIBODY
LONG PEG CHAIN
SURFACE OF LATEX
SHORT PEG CHAIN**