

(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2016-105041

(P2016-105041A)

(43) 公開日 平成28年6月9日(2016.6.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/553 (2006.01)	G O 1 N 33/553	
G O 1 N 33/533 (2006.01)	G O 1 N 33/533	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	N
B 8 2 Y 40/00 (2011.01)	B 8 2 Y 40/00	
B 8 2 Y 5/00 (2011.01)	B 8 2 Y 5/00	
審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 12 頁)		

(21) 出願番号 特願2013-44851 (P2013-44851)
 (22) 出願日 平成25年3月7日 (2013.3.7)

(71) 出願人 307011381
 株式会社スディックスバイオテック
 鹿児島県鹿児島市城山一丁目4番1号
 (71) 出願人 504258527
 国立大学法人 鹿児島大学
 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号
 (71) 出願人 304019399
 国立大学法人岐阜大学
 岐阜県岐阜市柳戸1番1
 (72) 発明者 隅田 泰生
 鹿児島県鹿児島市下伊敷一丁目1番1号
 106
 (72) 発明者 若尾 雅広
 鹿児島県鹿児島市原良3丁目11-8-1
 03

最終頁に続く

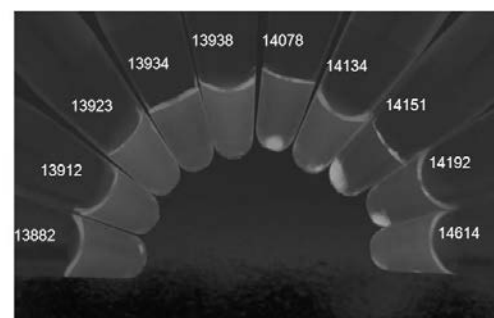
(54) 【発明の名称】 免疫性末梢神経障害症由来抗体を認識する組成物とその利用

(57) 【要約】

【課題】ギラン・バレー症候群など、免疫性末梢神経障害症の患者血清中に存在するガングリオシド結合性の自己抗体を、迅速、簡便に検出できるガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子とその検出方法の提供。

【解決手段】ガングリオシド G M 1 等の糖鎖部分を化学合成、または天然物から単離、または市販品を独自開発の蛍光性リンカーと結合させて糖鎖リガンド複合体を作製し、それを固定化したカドミウムとテルルからなる蛍光を発する金属粒子などに固定化し、ガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子を作製した。そして、そのガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子と末梢神経障害症の患者血清とを混合し、1～3時間放置、遠心分離することによって、ギラン・バレー症候群の患者血清に特異的な蛍光を発する凝集体を形成させる。その凝集体を目視で観察することによって、迅速、簡便にギラン・バレー症候群の診断をおこなう。

【選択図】図12



血清サンプル

13912	抗 GM1 抗体陰性血清 (抗 GD1a 抗体陰性)	14078	抗 GM1 抗体陽性血清
13923		14134	
13938		14151	
13882		14192	
13934	抗 GM1 抗体陽性血清 (抗 GD1a 抗体陽性)	14614	

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ガングリオシド G M 1 糖鎖とカドミウム及びテルルからなる蛍光を発する金属ナノ粒子からなるガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子。

【請求項 2】

請求項 1 に示すガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子と患者血清を混合することによって、固定化されているガングリオシド糖鎖に特異的に反応する自己抗体を検出する方法。

【請求項 3】

ガングリオシド G M 1 糖鎖と亜鉛、銀、インジウム、硫黄からなる蛍光を発する金属ナノ粒子からなるガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子。

10

【請求項 4】

請求項 3 に示すガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子と患者血清を混合することによって、固定化されているガングリオシド糖鎖に特異的に反応する自己抗体を検出する方法。

【請求項 5】

ガングリオシド G D 1 a 糖鎖とカドミウム及びテルルからなる蛍光を発する金属ナノ粒子からなるガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子。

【請求項 6】

請求項 5 に示すガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子と患者血清を混合することによって、固定化されているガングリオシド糖鎖に特異的に反応する自己抗体を検出する方法。

20

【請求項 7】

ガングリオシド G D 1 a 糖鎖と亜鉛、銀、インジウム、硫黄からなる蛍光を発する金属ナノ粒子からなるガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子。

【請求項 8】

請求項 7 に示すガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子と患者血清を混合することによって、固定化されているガングリオシド糖鎖に特異的に反応する自己抗体を検出する方法。

【請求項 9】

ガングリオシド G Q 1 b 糖鎖とカドミウム及びテルルからなる蛍光を発する金属ナノ粒子からなるガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子。

30

【請求項 10】

請求項 9 に示すガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子と患者血清を混合することによって、固定化されているガングリオシド糖鎖に特異的に反応する自己抗体を検出する方法。

【請求項 11】

ガングリオシド G Q 1 b 糖鎖と亜鉛、銀、インジウム、硫黄からなる蛍光を発する金属ナノ粒子からなるガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子。

【請求項 12】

請求項 11 に示すガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子と患者血清を混合することによって、固定化されているガングリオシド糖鎖に特異的に反応する自己抗体を検出する方法。

40

【請求項 13】

請求項 1 から 12 のいずれかに記載の糖鎖またはナノ粒子を含む、ギラン・バレー症候群をはじめとした免疫性末梢神経障害症の検出試薬または診断薬。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、ガングリオシドの糖鎖部分を固定化した蛍光性ナノ粒子およびその利用に関

50

する。

【背景技術】

【0002】

免疫性末梢神経障害症であるギラン・バレー（Guillain-Barré）症候群（GBS）は、急性に発症する四肢筋力低下と深部腱反射消失を主徴とする末梢神経疾患である。急性に四肢筋力低下を呈する神経・筋疾患の中で最も頻度が高い。そのほか、GBSには、Fisher症候群（FS）やBickersstaff型脳幹脳炎（BBE）など、様々な類縁疾患あるいは亜型が知られている（非特許文献1）。

【0003】

ガングリオシドはシアル酸を有する酸性糖脂質で、神経細胞膜に豊富に存在する。脂肪酸を有し疎水性を示すセラミドと、親水性のオリゴ糖から成り、主に生理活性を有するのは細胞表面に露出した形で存在するオリゴ糖の部分であるとされている。

10

【0004】

ガングリオシドに対する抗体が、GBSやFSを中心に、自己免疫性末梢神経疾患の病因物質として注目されている。GBSやFSでは、血液中に抗ガングリオシド抗体が検出される。発症直後に最も抗体価が高く、経過とともに低下、消失する（非特許文献2）。

【0005】

先行感染病原体とガングリオシドとの分子相同性が存在することが確認されただけでなく、動物モデルも樹立され、病原体と神経組織の分子相同性による発症機序が証明されている（非特許文献3、非特許文献4、非特許文献5）。

20

【0006】

抗ガングリオシド抗体検索は、すでに臨床的に汎用されている。GBSではGM1、GM1b、GD1a、GalNAc-GD1aに対するIgG抗体が、Fisher症候群やBickersstaff型脳幹脳炎、急性外眼筋麻痺ではIgG抗GQ1b抗体が、補助診断として有用である。

【0007】

抗ガングリオシド抗体の測定法としては、ELISA法がある。ELISA法とは、Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assayの略であり、試料中に含まれる抗体あるいは抗原の濃度を検出・定量する際に用いられる方法である。生体試料中に特定のタンパク質が微量にしか存在しない場合は、特異性の高さ（夾雑物からどれだけ正確に区別できるか）と定量性の良さ（微量であっても検出できる、あるいは低濃度における再現性の良さ）が求められる。ELISAは特異性の高い抗原抗体反応を利用し、酵素反応に基づく発色・発光をシグナルに用いることで上記の条件をクリアしている。

30

【0008】

GBSの効果的な治療法として、血漿交換療法と免疫グロブリンの大量静脈注射療法が確立されている（非特許文献1）。

【0009】

以上のように、研究レベルではGBS関連疾患と抗ガングリオシド抗体の関係が解明され、臨床現場で利用できる抗糖脂質抗体の測定方法としてELISA法（非特許文献5）が実用化された。

40

【0010】

しかし、ELISA法は時間と手間がかかり、通常は検査会社へ患者の血清を送り、その結果を1週以上待たねばならない。そのため、迅速診断キットが求められている。本発明は、ガングリオシドの糖鎖を固定化したナノ粒子を用いた迅速簡便な診断法の開発を目的とした。

【0011】

我々はこのような背景に立脚して研究を開始し、ガングリオシドの「糖鎖」に標的を定め、最新のナノテクノロジーを駆使して迅速簡便な診断法の開発を行ってきた。本発明では、いままでに開発してきた糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子の技術（特許文献1、非特許文献

50

7)に基づき、ガングリオシドGM1の糖鎖部分を固定化した蛍光性ナノ粒子を新規に調製し、それを用いて患者血清中のGBSに深く関係する抗体の検出に成功した。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】特願2010-53040、糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子、及びその製造方法；発明者：若尾雅広、隅田泰生；出願人：国立大学法人鹿児島大学、株式会社スディックスバイオテック

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】N. Yuki, H. P. Hartung, Guillain-Barre syndrome, N. Engl. J. Med., 2012; 366: 2294-304

【非特許文献2】Odaka M, Koga M, Yuki N, Susuki K, Hirata K. Longitudinal changes of anti-ganglioside antibodies before and after Guillain-Barre syndrome onset subsequent to Campylobacter jejuni enteritis. J. Neurol. Sci. 2003; 210: 99-103.

【非特許文献3】Yuki N, Taki T, Inagaki F, Kasama T, Takahashi M, Saito K, Handa S, Miyatake T. A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barre syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. J. Exp. Med. 1993; 178: 1771-1775.

【非特許文献4】N. Yuki, K. Susuki, M. Koga, Y. Nishimoto, M. Odaka, K. Hirata, K. Taguchi, T. Miyatake, K. Furukawa, T. Kobata, M. Yamada, Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and Campylobacter jejuni lipooligosaccharide causes Guillain-Barre syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004; 101: 11404-11409.

【非特許文献5】N. Yuki, M. Yamada, M. Koga, M. Odaka, K. Susuki, Y. Tagawa, S. Ueda, T. Kasama, A. Ohnishi, S. Hayashi, H. Takahashi, M. Kamijo, K. Hirata, Animal model of axonal Guillain-Barre syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside. Ann. Neurol. 2001; 49: 712-720.

【非特許文献6】小鷹昌明、秋山真弓、結城伸泰、Guillain-Barre 症候群、Fisher 症候群における抗GM1、抗GQ1b 抗体の臨床的有用性、モダンメディア 2008; 54 (3): 82-86.

【非特許文献7】H. Shinchii, M. Wakao, S. Nakagawa, E. Mochizuki, S. Kuwabata, Y. Suda, Stable Sugar-Chain-Immobilized Fluorescent Nanoparticles for Probing Lectin and Cells. Chem. Asian J., 2012; 7: 2678-2682.

【非特許文献8】Sato, M., Ito, Y., Arima, N., Baba, M., Sobel, M., Wakao, M., Suda, Y.,

10

20

30

40

50

High-sensitivity analysis of naturally occurring sugar chains, using a novel fluorescent linker molecule, J. Biochem, 2009; 146: 33-41.

【非特許文献9】: T. Yoshikawa, Y. Kato, N. Yuki, T. Yabe, H. Ishida, M. Kiso, Glycoconjugate J. 2008; 25: 545-553.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

10

本発明は、GBS患者血清中に存在するガングリオシドに対する抗体に対して特異的な反応性を有し、かつその検出を3時間以内に可能とする簡便な検査診断ツールを提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明では以上の知見にもとづき、GBSの新規検査診断法のための簡便なツールの開発を目指し、ガングリオシドの糖鎖部分を固定化した蛍光性ナノ粒子を調製した。

【0016】

本発明は、医学上または産業上有用な方法・物質として下記1)~3)の発明を含むものである。

20

1) ガングリオシドGM1の糖鎖部分に蛍光性のリンカーを結合させた構造を有する糖鎖リガンド複合体。

2) 平均粒径が8.9nmの大きさをもつ、上記糖鎖リガンド複合体が固定化された蛍光性ナノ粒子。

3) 蛍光性ナノ粒子には、コアシェル構造を有するカドミウムとテルル、または亜鉛、銀、インディウム、硫黄を構成元素としてもつ半導体ナノ粒子。

【発明の効果】

【0017】

本発明のガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子は、GBS患者の血清中に存在する抗GM1抗体と特異的に結合し、会合体を形成する作用を有する。

30

【0018】

GBSは臨床症状が脳血栓と似ており、迅速な検査法が求められている。本発明の糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子を用いれば、患者の血清を直接使用し、数時間以内に可視で検査結果を確認できるものであるため、実用化の可能性は極めて高い。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】ガングリオシドGM1の糖鎖部分にGlucを導入したGM1-Glc糖鎖の化学構造である。

【図2】GM1-Glc糖鎖を合成する際の間体の合成経路である。

【図3】GM1-Glc糖鎖を合成する際に必要な二糖構造の合成経路である。

40

【図4】GM1-Glc糖鎖を合成するためのグリコシレーションと脱保護を示す経路である。

【図5】GM1-Glcから調製したGM1糖鎖を含む糖鎖リガンド複合体(GM1-f-mono)の化学構造である。

【図6】GM1糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子(GM1-FNP)の調製法の概略である

【図7】GM1糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子(GM1-FNP)のDLS測定による粒径分布である。

【図8】GM1糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子(GM1-FNP)のPositive modeによるMALDI-TOF/MS分析の結果である。

【図9】GM1糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子(GM1-FNP)のNegative modeによるMALDI-TOF/MS分析の結果である。

50

ode による MALDI - TOF / MS 分析の結果である。

【図 10】GM1 糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子 (GM1 - FNP) と糖鎖結合性タンパク質との凝集実験における遠心分離後の沈殿物の蛍光発光の結果である。

【図 11】GM1 糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子 (GM1 - FNP) と糖鎖結合性タンパク質との凝集実験における遠心分離後の上澄みの蛍光スペクトルである。

【図 12】GM1 糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子 (GM1 - FNP) と免疫性末梢神経障害症の患者の血清との凝集実験における遠心分離後の沈殿物の蛍光発光の結果である。

【図 13】GM1 糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子 (GM1 - FNP) と免疫性末梢神経障害症の患者の血清との凝集実験におけるインキュベーション時間を変えた際の、遠心分離後の沈殿物の蛍光発光の結果である。

10

【発明を実施するための形態】

【0020】

以下に本発明について詳述する。ガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子は、以下のようにして作製することができる。化学合成により、保護基を有するガングリオシド糖鎖構造を得、さらに 1、2、3、4 位を保護したグルコースを反応させる。最後に、保護基を除去して、還元末端にグルコースを有するガングリオシド糖鎖を合成する。次いで、その糖鎖に、独自開発の蛍光性リンカー化合物 (非特許文献 8) を還元アミノ化反応によって導入し、リンカーが蛍光を呈する事を利用して精製し、ガングリオシド糖鎖リガンド複合体を得る。そのリガンド複合体を既存の方法 (特許文献 2、非特許文献 7) によってコア/シェル型の蛍光性ナノ粒子に固定化し、遠心限界濾過法によって精製して作製することができる。

20

【0021】

作製したガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子を緩衝液で希釈し、患者血清を加えてプラスチックチューブ中で混合し、数時間放置した後、遠心分離する。ガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子の糖鎖と結合する自己抗体が血清中に存在する場合は、蛍光を発する沈殿物がえられるため、簡便かつ肉眼で検査結果を得ることができる。

【0022】

蛍光性ナノ粒子に糖鎖が固定化されていることについては、例えば、ナノ粒子を MALDI - TOF 型の質量分析計で測定すればよい。この際、ナノ粒子と硫黄 - 金属結合で固定化されているガングリオシド糖鎖リガンド複合体が、硫黄 - 金属結合で還元的に分解するために、ガングリオシド糖鎖リガンド複合体が固定化されている場合は、それに相当する分子イオンピーク (m/z) が観測される。

30

【0023】

また、ガングリオシド糖鎖を構成している糖鎖と特異的に結合する事が既知であるレクチン (糖鎖結合性蛋白質) を用いて、ガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子の凝集と遠心分離による沈殿物生成を調べればよい。

【0024】

本発明で開示されるガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子は、ガングリオシド糖鎖として GM1 - Glc (非特許文献 8) と称する糖鎖を用いているが、その適用はその分子形態に限定されることはない。例えば、GM1 糖鎖そのものを使用したり、GD1a や GQ1b といった別の構造のガングリオシド糖鎖をもちいた場合もその適用範囲に含まれる。

40

【0025】

また、本発明で開示されるガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子は、蛍光性ナノ粒子として、Cd と Te で構成されるコア/シェル型の量子ドットをその基本構造としているが、Zn、Ag、In、S から構成される ZAIS と一般に称されるナノ粒子を用いた場合もその適用範囲に含まれる。

【0026】

また、これらのガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子は、固定化した糖鎖の局所密度をオリゴエチレングリコールを共固定化することによって調製した蛍光性ナノ粒子もそ

50

の適用範囲に含まれる。

【0027】

本発明のガングリオシド糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子は、ギラン・バレー症候群などの末端神経麻痺症などの迅速・簡便検出試薬及び診断薬として利用可能である。

【実施例】

【0028】

以下、本発明を実施例に基づき詳細に説明するが、本発明は何らこれらに限定されるものではない。

【0029】

《実施例1：GM1-Glc糖鎖の合成》

10

目的のGM1-Glc糖鎖1は図1に示す。

まず、図2に示すように、GM1-コアとなる四糖構造4はNISとTfOHの存在下、二糖Gal β 1-3GalN₂とNeuAc α 2-3Gal₃と縮合させ、89%の収率で調製した。続いて、四糖構造を対応するグルコシド供与体6として、5ステップで導いた。

次に、図3に従って、糖受容体となる非還元末端グルコースの4位をフリーとし、かつ、保護基をベンジル基とすることによって、4位の水酸基の反応性を高めたゲンチピオース11を以下のように調製した。グルコース糖供与体7と糖受容体8をNISとTfOHの存在下、ジクロロメタン中0で反応させることによって、二糖9を90%の収率で得た。

20

そして、ベンジリデン基を、ジクロロメタン中、トリメチルシランとBF₃·OEt₂で処理することによって、選択的に開裂させ、11を85%の収率で得た。11のスペクトルデータは以下の通りである。[α]_D = -12.9° (c 1.0, CHCl₃) ; ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.35-7.21 (m, 35 H, 7 Ph), 5.01-4.69 (m, 10 H, 5 CHHPh), 4.59-4.51 (m, 3 H, H-1f, CHHPh), 4.46 (d, 1 H, J_{1,2} = 9.6 Hz, H-1e), 4.19 (d, 1 H, J_{gem} = 11.0 Hz, H-6e), 3.74-3.58 (m, 6 H, H-6'e, 3f, 4f, 5f, 6f, 6'f), 3.50-3.39 (m, 5 H, H-2f, 2e, 3e, 4e, 5e), 2.54 (s, 1 H, -OH) ; ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 138.9, 138.7, 138.5, 138.5, 138.2, 138.0, 137.6, 128.6, 128.5, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 104.1, 102.7, 84.8, 84.2, 82.4, 81.6, 78.4, 77.3, 75.8, 75.4, 75.3, 75.1, 74.9, 74.8, 74.1, 73.8, 71.8, 71.3, 68.8, 29.8 ; MALDI MS: m/z: calcd for C₆₁H₆₄O₁₁Na: 995.43 ; found: 995.38 [M+Na]⁺.

30

40

そして図4のように、上記のようにして合成したGM1コア糖供与体6と二糖11とをジクロロメタン中TMSOTfの存在下で反応させ、望む β グリコシド12を69%の収率で得た。次いで、アシル系の保護基を除去して13を得、最後にベンジル基を水素化分解してGM1-Glc糖鎖1をほぼ定量的に得た。1のスペクトルデータは以下の通りである。[α]_D = +0.1° (c 1.0, H₂O) ; ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ 5.16 (d, 1 H, J_{1,2} = 3.7 Hz, H-1e), 4.79 (d, 1 H, H-1c), 4.57 (d, 1 H, J_{1,2} = 8.0 Hz, H-1d), 4.49-4.45 (m, 3 H, H-1a, 1b, 1f), 4.15-3.19 (m, 39 H, ring H), 2.62 (dd, 1 H, H-3beq), 1.99 and 1

50

. 96 (2 s, 6 H, 2 Ac), 1.87 (m, 1 H, H-3 b
ax), ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ 175.0, 1
74.8, 174.1, 106.1, 105.7, 105.5, 104.1,
104.0, 103.4, 101.8, 97.0, 95.3, 94.2,
93.0, 91.5, 84.4, 81.2, 78.1, 77.6, 76.5
, 75.1, 74.8, 74.5, 74.3, 73.9, 73.5, 73
.4, 72.6, 72.1, 71.5, 70.8, 70.2, 68.9,
68.0, 67.1, 61.2, 61.0, 60.7, 59.7, 59.3
, 58.8, 52.5, 51.6, 48.8, 47.5, 28.7, 25
.9, 23.5; MALDI MS: m/z: calcd for C_{43}H_7
 N_2O : 1160.40; found: 1159.75 [M-H] $^-$.

10

【0030】

《実施例2：GM1糖鎖リガンド複合体の合成と分画》

実施例1で合成した還元末端に6-グルコースを有するGM1ガングリオシド糖鎖 (GM1-Glc, 1.0 mg, 0.86 μmol) を超純水 20 μL に溶解し、独自開発の
蛍光性リンカー化合物 (f-mono, 0.28 mg, 1.1 μmol) のN、N-ジメ
チルホルムアミド 30 μL 溶液に加え、さらに酢酸 6 μL を加えた。40 で6時間放置
した後、 NaCNBH_3 (1.5 mg, 24 μmol) を10 μL の超純水に溶解させ
た溶液を加え、40 で3日間放置し、凍結乾燥した。この凍結乾燥残渣を超純水に溶解
させ、ODSカラムで精製した (溶出溶媒：水/メタノール 1/1 (v/v))。溶出
画分を凍結乾燥し、図5に示すGM1糖鎖リガンド複合体 (GM1-f-monoと略)
を白色粉末として得た。収量：0.69 mg (56%)。MS calcd. for
: $\text{C}_{56}\text{H}_{92}\text{N}_5\text{O}_{34}\text{S}_2$: 1442.51, Found: m/z 14
42.73 [M-H] $^-$.

20

【0031】

《実施例3：GM1糖鎖を固定化した蛍光性ナノ粒子の調製》

図6に示すようにCdCl₂ (9.17 mg, 50.0 μmol) と3-メルカプトプ
ロピオン酸 (3-MPA, 5.45 μL , 63 μmol) を超純水 10 mL に溶かし、
溶液のpHを1M NaOHで9に合わせ、攪拌しながらアルゴンガスを30分間バブリ
ングしたのち、溶液を激しく攪拌しながら105 に加熱した。別のフラスコに、テルル
粉体 (16.0 mg, 0.125 mmol) と NaBH_4 (18.9 mg, 0.500
mmol) をアルゴン下で脱気した超純水 (2 mL) に溶解させ、室温下1.5時間攪拌
した。この溶液 (NaHTe 溶液、200 μL) を105 で加熱攪拌している溶液に加
え、同温度でさらに2時間攪拌し、室温に戻した。その溶液に、2-プロパノールをくわ
えて、Cd/Teの量子ドット (QD) を沈殿させ、それをろ別後に再度水を加えて溶解
させた。その溶液を4 で10時間放置した後、チオアセトアミド (0.27 μL , 1.
33 μM) をさらに加えた。そして、105 で57時間攪拌し、室温に戻すことによっ
てCdTe/CdS core/shell QD溶液を得た。実施例2で調製したGM
1-f-mono (1 mM, 50 μL) を NaBH_4 の水溶液 (10 mM, 50 μL)
を室温で混合し、10分間放置した。その後、CdTe/CdS core/shell
QD溶液を5倍に薄めた溶液 100 μL を加え、暗所で室温24時間攪拌した。未反応
の糖鎖リガンド複合体はAmicon Ultra 10 K (Millipore, M
A, USA) を用いた遠心限外濾過 (14000 $\times g$, 5 min) によって除去し、さら
に引き続いて超純水で3回洗浄、最後にPBSで懸濁させることによってGM1糖鎖固定
化蛍光性ナノ粒子 (GM1-SFNP) 溶液を調製した。図7に示すようにDLS測定 (
Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments
, Worcestershire, UK) によれば、このナノ粒子の平均粒径は8.
9 nmであった。

30

40

QD溶液を5倍に薄めた溶液 100 μL を加え、暗所で室温24時間攪拌した。未反応
の糖鎖リガンド複合体はAmicon Ultra 10 K (Millipore, M
A, USA) を用いた遠心限外濾過 (14000 $\times g$, 5 min) によって除去し、さら
に引き続いて超純水で3回洗浄、最後にPBSで懸濁させることによってGM1糖鎖固定
化蛍光性ナノ粒子 (GM1-SFNP) 溶液を調製した。図7に示すようにDLS測定 (
Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments
, Worcestershire, UK) によれば、このナノ粒子の平均粒径は8.
9 nmであった。

【0032】

《実施例4：MALDI-TOF/MSによる固定化したガングリオシド糖鎖リガンド複

50

合体の確認》

実施例 3 で調製した G M 1 糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子溶液 1 μ L を飽和 D H B A 溶液 (水 / メタノール 1 / 1 溶液) 1 0 μ L と混合し、1 μ L を測定プレートに載せ、自然乾燥させた。そのプレートを V o y a g e r - D E - P R O (A p p l i e d B i o s y s t e m s 、 C A 、 U S A) の測定部へ入れ、質量分析を行った。図 8 と図 9 に示すように、実施例 2 で調製した G M 1 糖鎖リガンド複合体と同じ質量数を有するピーク (m / Z 値) が得られ、ナノ粒子に G M 1 糖鎖が固定化されていることが確認された。

【 0 0 3 3 】

《実施例 5 : G M 1 糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子の蛋白質結合能の確認》

蛋白質 C o n c a n a v a l i n A (C o n A) 、 W h e a t g e r m a g g l u t i n i n (W G A) 、 P e a n u t a g g l u t i n i n (P N A) 、 R i c i n c o m m u n i s a g g l u t i n i n I (R C A 1 2 0) 、 B o v i n e s e r u m a l b u m i n (B S A) に対しての G M 1 糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子の結合活性を調べた。B S A 以外は、糖鎖結合性蛋白質 (レクチン) である。各蛋白質を P B S に 3 . 6 μ M の濃度で溶解させ、その 5 μ L を 2 0 0 μ L の容量のプラスチックチューブに移した。そこに、実施例 3 で調製した G M 1 糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子の 0 . 2 μ M の P B S 溶液を 5 μ L 加え、ポアテックスミキサーで攪拌後暗所に一定時間放置後、1 4 0 0 0 G で 5 分間遠心分離を行った。チューブに紫外光を照射し、沈殿物の蛍光を観測して写真撮影を行った後、上清の蛍光スペクトルを測定した。図 1 0 に示すように、P N A にのみ、目視で判別可能な蛍光を発する沈殿が生じ、また図 1 1 に示すように、P N A の上澄みの蛍光強度だけが大きく減少し、G M 1 糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子の糖鎖が特異的に P N A と結合し、その結果会合体を形成したことを示した。

10

20

【 0 0 3 4 】

《実施例 6 : G M 1 糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子と患者血清との反応》

ギラン・バレー症候群の患者を含めた免疫性末梢神経障害症の患者血清 5 μ L を 2 0 0 μ L の容量のプラスチックチューブに移した。そこに、実施例 3 で調製した G M 1 糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子の 0 . 1 μ M の P B S 溶液を 5 μ L 加え、ポアテックスミキサーで攪拌後暗所に一定時間放置後、1 4 0 0 0 G で 5 分間遠心分離を行った。チューブに紫外光を照射し、沈殿物の蛍光を観測して写真撮影を行った後、上清の蛍光スペクトルを測定した。図 1 2 に示すように、既存の E L I S A 法で抗 G M 1 抗体陽性の血清を使用した場合にのみ、蛍光を発する沈殿物の形成が確認され、そのチューブの上清の蛍光強度は著しく減少した。一方、抗 G Q 1 b 抗体陽性や抗 G D 1 b 抗体陽性の血清の場合には、蛍光を発する沈殿物の形成は確認されず、チューブ中の溶液の蛍光強度にも変化がなかった。この変化は、図 1 3 に示すようにナノ粒子を血清サンプルへ添加して混合後 3 時間で変化が確認された。

30

【 0 0 3 5 】

《実施例 7 : G M 1 糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子と会合体を形成した患者血清中の蛋白質の同定》

実施例 6 で蛍光を発する沈殿物に、抗体が存在することを、沈殿物の S D S - P A G E を行って確認した。沈殿物を P B S で再度分散させ、S D S - P A G E のサンプル調製用バッファ (還元条件、及び非還元条件) を加え、還元条件では 1 0 % ゲル、非還元条件では 8 % ゲルにアプライし、泳動後に銀染色した。I g G の重鎖、軽鎖、F c に相当する蛋白質バンドが観測され、G M 1 糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子が血清中の抗体と選択的に結合したことが分かった。

40

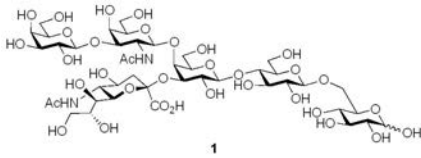
【産業上の利用可能性】

【 0 0 3 6 】

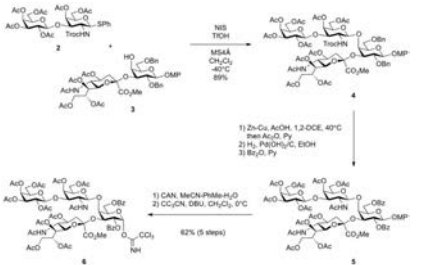
以上の結果より、ガングリオシドの糖鎖部分を固定化した蛍光性ナノ粒子については、ギラン・バレー症候群やフィッシャー症候群など免疫性末梢神経障害症の迅速・簡便な診断法として、医療現場での利用可能性が大いに期待される。

50

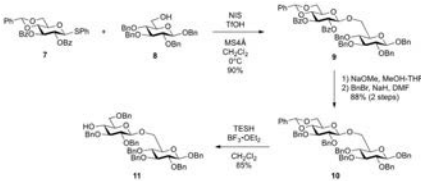
【図 1】



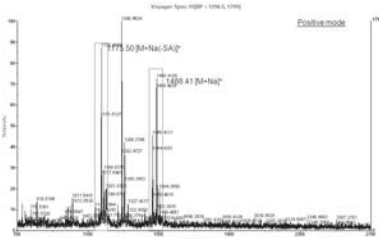
【図 2】



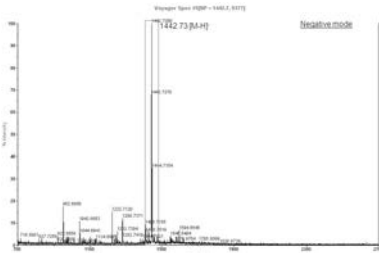
【図 3】



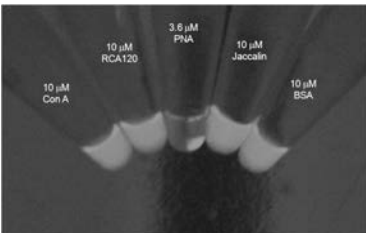
【図 8】



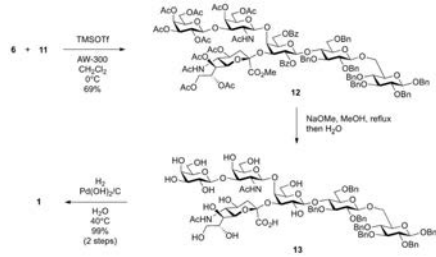
【図 9】



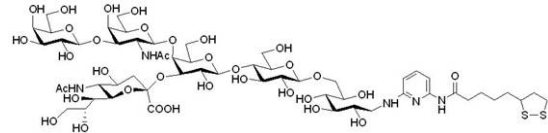
【図 10】



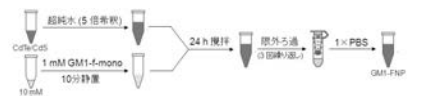
【図 4】



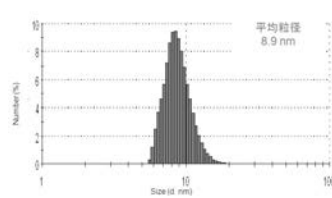
【図 5】



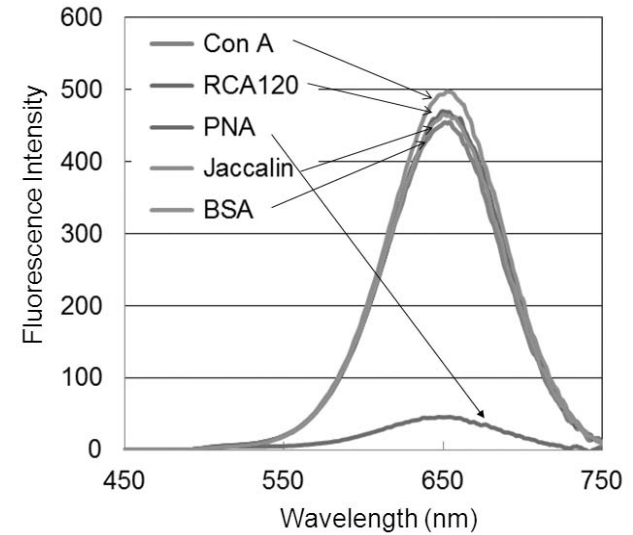
【図 6】



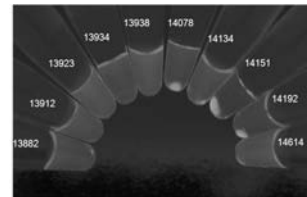
【図 7】



【図 11】

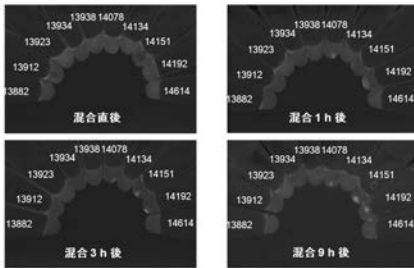


【図 12】



血清サンプル	
13912	抗 GM1 抗体陽性血清
13923	抗 GM1α 抗体陽性血清
13938	抗 GM1β 抗体陽性血清
13982	抗 GM1 抗体陽性血清
13994	抗 GM1α 抗体陽性血清
14078	抗 GM1 抗体陽性血清
14134	抗 GM1α 抗体陽性血清
14151	抗 GM1 抗体陽性血清
14192	抗 GM1α 抗体陽性血清
14614	抗 GM1α 抗体陽性血清

【図 13】



フロントページの続き

(72)発明者 石田 秀治

岐阜県岐阜市光町2丁目2-403

(72)発明者 結城 伸泰

シンガポール共和国 クレメンティロード 103、セントベール ブロック A、 #08-04

专利名称(译)	识别来自免疫周围神经病的抗体的组合物及其用途		
公开(公告)号	JP2016105041A	公开(公告)日	2016-06-09
申请号	JP2013044851	申请日	2013-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	SUDX BIOTEC CORP 国立大学法人岐阜大学		
申请(专利权)人(译)	公司扫描迪克斯生物技术 国立大学法人鹿儿岛大学 国立大学法人岐阜大学		
[标]发明人	隅田泰生 若尾雅広 石田秀治 結城伸泰		
发明人	隅田 泰生 若尾 雅広 石田 秀治 結城 伸泰		
IPC分类号	G01N33/553 G01N33/533 G01N33/53 B82Y40/00 B82Y5/00		
CPC分类号	G01N33/564 B82Y15/00 B82Y40/00 G01N33/54346 G01N2405/10		
FI分类号	G01N33/553 G01N33/533 G01N33/53.N B82Y40/00 B82Y5/00		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

甲像Guillain-Barre综合征，神经节苷脂存在于免疫的外周神经病变疾病的患者血清中自身抗体的结合，迅速，方便地检测的神经节苷脂的糖链固定荧光纳米粒子及其检测方法提供。如A神经节苷脂碳水化合物部分制备化学合成，或者从天然的或商业上分离通过用荧光接头专有碳水化合物配体复合物来固定它耦合等固定萤火虫荧光固定由镉和碲的金属颗粒，神经节苷脂糖链制备光子纳米粒子。然后，通过混合神经节苷脂的糖链的患者血清与固定外周神经病变疾病的荧光纳米颗粒，1-3小时，通过离心，特定于患者血清吉兰-巴雷综合征的荧光站在形成散发的凝聚物。通过目视观察骨料，可以快速方便地诊断格林-巴利综合征。

14078
14134
14151
14192
14614

抗GM1 抗体陽性血清