

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4877509号
(P4877509)

(45) 発行日 平成24年2月15日(2012.2.15)

(24) 登録日 平成23年12月9日(2011.12.9)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 0 1 J

GO 1 N 33/543 5 2 5 U

請求項の数 7 (全 8 頁)

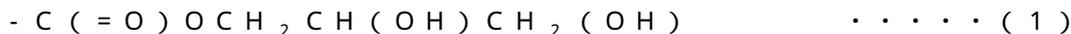
<p>(21) 出願番号 特願2007-28900 (P2007-28900)</p> <p>(22) 出願日 平成19年2月8日(2007.2.8)</p> <p>(65) 公開番号 特開2008-191129 (P2008-191129A)</p> <p>(43) 公開日 平成20年8月21日(2008.8.21)</p> <p>審査請求日 平成21年9月2日(2009.9.2)</p>	<p>(73) 特許権者 000004178 J S R株式会社 東京都港区東新橋一丁目9番2号</p> <p>(74) 代理人 100090398 弁理士 大淵 美千栄</p> <p>(74) 代理人 100090387 弁理士 布施 行夫</p> <p>(72) 発明者 田守 功二 東京都中央区築地五丁目6番10号 J S R株式会社内</p> <p>(72) 発明者 宮路 正昭 東京都中央区築地五丁目6番10号 J S R株式会社内</p> <p>審査官 廣田 健介</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
---	---

(54) 【発明の名称】 ブロッキング剤ならびにプローブ結合粒子およびその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式(1)で示される官能基を有する水溶性重合体からなるブロッキング剤。



【請求項 2】

請求項 1 において、

前記水溶性共重合体は、2, 3-ジヒドロキシプロピル(メタ)アクリレート50~99質量部と、その他のモノマー50~1質量部とを共重合して得られる、ブロッキング剤。

【請求項 3】

粒子の表面にプローブを結合させる工程と、

前記プローブが結合された前記粒子を、請求項 1 または 2 に記載のブロッキング剤を用いて処理する工程と、

を含む、プローブ粒子の製造方法。

【請求項 4】

請求項 3 において、

前記プローブを結合させる工程において、前記粒子は、カルボキシル基、活性エステル基、トシル基、アミノ基およびエポキシ基から選ばれる少なくとも1種の基を有する、プローブ結合粒子の製造方法。

【請求項 5】

請求項 3 または 4 において、

前記粒子は、磁性粒子である、プローブ結合粒子の製造方法。

【請求項 6】

請求項 3 ないし 5 のいずれかに記載のプローブ結合粒子の製造方法によって得られるプローブ結合粒子。

【請求項 7】

請求項 1 または 2 に記載のブロッキング剤を表面に有する、プローブ結合粒子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、例えば免疫診断用粒子の表面に適用可能なブロッキング剤ならびにプローブ結合粒子およびその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、疾病の早期発見等の目的のため、検査の高感度化が求められており、診断薬の感度向上は大きな課題となっている。磁性粒子などの固相を用いた診断薬においても、感度向上のため、検出方式として酵素発色を用いる方式から、より高い感度が得られる蛍光や化学発光を用いる方式へと切り替わりつつある。これらの検出技術の発展により、理論上は一分子の検査対象物質の存在まで検出できるレベルに達しているといわれているが、実際には十分な感度が得られていない。その原因としては、血清などの生体分子混在下で特定の物質を検出する診断では、共存する生体分子や 2 次抗体、発光基質などが固相へ非特異的に吸着し、その結果、ノイズが増加して高感度化の妨げとなっている。そのため、免疫診断測定においては、特異的に結合する物質以外の物質が免疫反応に使用する固相表面に非特異的に吸着することによる感度の低下を軽減するため、通常、アルブミン、カゼイン、ゼラチン等の生物由来物質をブロッキング剤として用いることにより、非特異吸着を抑制して、ノイズを低減させている。

【0003】

しかしながら、従来法によるブロッキング操作を施しても、なお、非特異的な吸着が残り、さらに、生体由来のブロッキング剤を用いる場合、BSE に代表される生物汚染の問題があることなどから、化学合成による高性能のブロッキング剤の開発が望まれている。

【0004】

化学合成によるブロッキング剤としては、特開平 11 - 287802 号公報や特許第 3407397 号にポリオキシエチレンを有するポリマーが提案されているが、ノイズ低減効果は不十分であった。

【特許文献 1】特開平 11 - 287802 号公報

【特許文献 2】特許第 3407397 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、製造が容易であり、十分なノイズ低減効果を有する化学合成のブロッキング剤ならびにプローブ結合粒子およびその製造方法を供することである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、この課題を解決するために、ブロッキング剤として製造が容易な合成方法を見だし、さらには、本ブロッキング剤を用いて、免疫診断用粒子を処理することにより、該粒子がシグナル増強効果を発現することを見だし、本発明を完成した。

【0007】

本発明の一態様に係るブロッキング剤は、

下記式 (1) で示される官能基を有する水溶性重合体からなる。

- C(=O)OCH₂CH(OH)CH₂(OH) ····· (1)

10

20

30

40

50

【 0 0 0 8 】

上記ブロッキング剤において、前記水溶性重合体は、2,3-ジヒドロキシプロピル(メタ)アクリレート50~99質量部と、その他のモノマー50~1質量部とを共重合して得ることができる。

【 0 0 0 9 】

本発明の一態様に係るプローブ結合粒子の製造方法は、
粒子の表面にプローブを結合させる工程と、
上記ブロッキング剤を用いて、前記プローブが結合された前記粒子を処理する工程と、
を含む。

【 0 0 1 0 】

上記プローブ結合粒子の製造方法において、前記プローブを結合させる工程において、前記粒子は、カルボキシル基、活性エステル基、トシル基、アミノ基、およびエポキシ基から選ばれる少なくとも1種の基を有することができる。

【 0 0 1 1 】

上記プローブ結合粒子の製造方法において、前記粒子は、磁性粒子であることができる。

【 0 0 1 2 】

本発明の一態様に係るプローブ結合粒子は、下記式(1)で示される官能基を有する。
- C(=O)OCH₂CH(OH)CH₂(OH) (1)

【 0 0 1 3 】

本発明の一態様に係るプローブ結合粒子は、上記プローブ結合粒子の製造方法によって得られる。

【 0 0 1 4 】

本発明の一態様に係るプローブ結合粒子は、上記ブロッキング剤を表面に有する。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 5 】

上記ブロッキング剤は、製造が容易であり、かつ、化学合成により製造できることから生物汚染の可能性がないうえ、従来用いられてきたブロッキング剤に比べて、ノイズ低減効果が高い。

【 0 0 1 6 】

また、上記ブロッキング剤は、免疫診断に使用される粒子(例えば磁性粒子)に用いた場合にシグナル増強効果を発現することができる。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 7 】

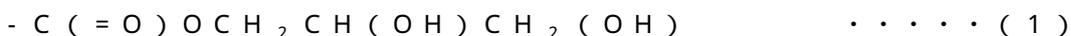
以下、本発明の一実施形態に係るブロッキング剤ならびにプローブ結合粒子およびその製造方法について説明する。

【 0 0 1 8 】

1. ブロッキング剤ならびにプローブ結合粒子およびその製造方法

1.1. ブロッキング剤の構造

本発明の一実施形態に係るブロッキング剤は、下記式(1)で示される官能基を有する水溶性重合体からなる。



【 0 0 1 9 】

水溶性重合体中に含まれる上記式(1)で示される官能基の量は、好ましくは1mmol/g以上、さらに好ましくは2mmol/g以上、最も好ましくは3~6mmol/gである。官能基の量が1mmol/g未満である場合、ノイズ低減効果に劣る場合がある。

【 0 0 2 0 】

水溶性重合体は、上記式(1)で示される官能基以外に、上記式(1)で示される官能基に含まれる水酸基以外の水酸基、アルコキシアルキル基、ポリオキシエチレン基、カル

10

20

30

40

50

ボキシル基、カルボニル基、スルホン基、1級～4級アミノ基、アミド基などの親水基；アルキル基、アリール基、カルボン酸アルキルエステル基などの疎水基を側鎖として含んでいてもよい。

【0021】

水溶性重合体の分子量は、好ましくは2,000以上、さらに好ましくは5,000以上、最も好ましくは1万～10万である。

【0022】

水溶性重合体は、上記式(1)で示される官能基を側鎖に有することが好ましい。この場合、水溶性重合体の主鎖としては、例えば、ポリエチレン、ポリエーテル、ポリアミド、ポリエステル、ポリカーボネートなどを挙げることができ、製造が容易であることから、好ましい主鎖はポリエチレンである。

10

【0023】

水溶性重合体としては、例えば、2,3-ジヒドロキシプロピル(メタ)アクリレート(以下、「グリセロール(メタ)アクリレート」ともいう。)の重合体、グリセロール(メタ)アクリレートとその他のモノマーとの共重合体、ビニル安息香酸グリセロールの重合体、ビニル安息香酸グリセロールとその他のモノマーとの共重合体、グルタミン酸グリセロールの重合体、グルタミン酸グリセロールとその他のモノマーとの共重合体(ポリアミド)、ヒアルロン酸グリセロールエステル誘導体の重合体、ヒアルロン酸グリセロールエステル誘導体とその他のモノマーとの共重合体(ポリエーテル)などが挙げられ、好ましくは、グリセロール(メタ)アクリレートとその他のモノマーとの共重合体である。

20

【0024】

1.2.ブロッキング剤の製造

本実施形態に係るブロッキング剤は、例えば、グリセロール(メタ)アクリレート、ビニル安息香酸グリセロール、グルタミン酸グリセロール、ヒアルロン酸グリセロールエステル誘導体などのモノマーを重合することにより製造することができる。このとき、その他のモノマーとの共重合にすることも好ましい。

【0025】

中でも、本実施形態に係るブロッキング剤として好ましいグリセロール(メタ)アクリレート共重合体の重合方法としては、例えば、(1)グリセロール(メタ)アクリレートとその他のモノマーを共重合する方法、(2)グリシジル(メタ)アクリレートとその他のモノマーを共重合し、グリシジル基を加水分解する方法などが挙げられ、より好ましくは(1)の方法である。

30

【0026】

(1)の重合方法で、好ましいモノマーの比率は、グリセロール(メタ)アクリレート50～99質量部とその他のモノマー50～1質量部であり、さらに好ましいモノマーの比率は、グリセロール(メタ)アクリレート60～98質量部とその他のモノマー40～2質量部である。

【0027】

その他のモノマーとしては、ヒドロキシエチル(メタ)アクリレート、アリールアルコールなどの水酸基を有するモノマー；メトキシエチル(メタ)アクリレート、ジエチレングリコールエチルエーテル(メタ)アクリレートなどのアルコキシアルキル基を有するモノマー；ポリエチレングリコール(メタ)アクリルエステル、ポリエチレングリコールジ(メタ)アクリルエステルなどのポリオキシエチレン基を有するモノマー；アクリル酸、メタクリル酸、イタコン酸、無類マレイン酸、クロトン酸などのカルボキシル基を有するモノマー；ダイアセトンアクリルアミド、アクロレイン、ホルミルスチロールなどのカルボニル基を有するモノマー；スチレンスルホン酸、イソプレンスルホン酸、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸などのスルホン基を有するモノマー；アリルアミン、アミノスチレン、N,N-ジメチルアミノプロピルアクリルアミド、N,N-ジメチルアミノプロピルアクリルアミドのメチルクロライド4級塩などの1級～4級アミノ基を有するモノマー；(メタ)アクリルアミド、N,N-ジメチル(メタ)アクリルアミドなど

40

50

のアミド基を有するモノマー；（メタ）アクリル酸メチル、（メタ）アクリル酸エチル、（メタ）アクリル酸プロピル、（メタ）アクリル酸ラウリル、（メタ）アクリル酸シクロヘキシル、（メタ）アクリル酸イソボニル、（メタ）アクリル酸ベンジル、スチレンなどの疎水性モノマーを挙げることができる。

【0028】

これらのモノマーのうち、アミノ基を有するモノマーを共重合することにより、アニオン性の固相表面とクーロン結合することが可能となり、ブロッキング効果を高めることが可能である。また、疎水性モノマーを共重合することにより、疎水性の固相表面と疎水結合することが可能となり、ブロッキング効果を高めることが可能である。

【0029】

本実施形態に係るブロッキング剤は、これらのモノマーと、必要に応じて副原料である重合開始剤、界面活性剤、電解質、分子量調節剤などを必要に応じて添加し、水、アルコール、THF、DMFあるいはこれらの混合液などの溶媒中で重合を行うことにより得ることができる。重合時間は好ましくは1～24時間、重合温度は好ましくは0～120である。

【0030】

なお、重合開始剤として、2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)ジハイドロクロライド(和光純薬工業社製「V-50」)、2,2'-アゾビス(1-イミノ-1-ピロリジノ-2-エチルプロパン)ジハイドロクロライド(和光純薬工業社製「VA-067」)などのカチオン性重合開始剤を使用することにより、ブロッキング剤がアニオン性の固相表面とクーロン結合することが可能となり、ブロッキング効果を高めることが可能である。このような重合開始剤の使用量は、モノマーの総量100質量部に対して好ましくは0.02～5質量部である。

【0031】

1.3. ブロッキング剤の用途ならびにプローブ結合粒子およびその製造

本実施形態に係るブロッキング剤は、従来の免疫診断測定において用いられたアルブミン、カゼイン、ゼラチン等を代替することにより、さらに非特異吸着を抑制して、ノイズを低減することができる。

【0032】

例えば、プレート法において、プレートへ抗体などのプローブを結合した後、本実施形態に係るブロッキング剤を添加して、プレート表面を処理することができる。

【0033】

また、本実施形態に係るブロッキング剤は例えば、プローブ結合粒子の製造に好適に使用することができる。本実施形態に係るプローブ結合粒子の製造方法は、粒子の表面にプローブを結合させる工程と、本実施形態に係るブロッキング剤を用いて、プローブが結合された粒子を処理する工程とを含む。

【0034】

ここで、本実施形態に係るブロッキング剤を用いて、プローブが結合された粒子を処理する工程は、例えば、本実施形態に係るブロッキング剤を粒子の表面に所定時間接触させることにより行うことができる。これにより、粒子表面における非特異吸着を抑制し、ノイズを低減することができる。また、この工程は例えば、本実施形態に係るブロッキング剤の溶液中に粒子を分散させた状態で行うことができる。

【0035】

この場合、プローブを結合させる粒子は、カルボキシル基、活性エステル基、トシル基、アミノ基、およびエポキシ基から選ばれる少なくとも1種の基を少なくとも表面に有することが好ましい(その理由については後述する)。また、この場合、粒子は磁性粒子であることが好ましい。

【0036】

より具体的には、例えば、イムノクロマト法において、着色粒子に抗体などのプローブを結合させた後、本実施形態に係るブロッキング剤を添加して、着色粒子の表面を処理す

10

20

30

40

50

ることにより、プローブ結合粒子を得ることができる。また、例えば、E I A、C L I A、C L E I Aなどのアッセイ法において、磁性粒子の表面に抗体などのプローブを結合させた後、本実施形態に係るブロッキング剤を添加して、該磁性粒子の表面を処理することにより、プローブ結合粒子を得ることができる。

【0037】

以上に説明したように、本実施形態に係るブロッキング剤は、上記式(1)で示される官能基を有する水溶性重合体からなることにより、非特異吸着を抑制して、ノイズを低減することができる。

【0038】

本実施形態に係るブロッキング剤を用いて、特にトシル基、エポキシ基などの活性基を少なくとも表面に有する粒子(例えば磁性粒子)を処理する場合、ブロッキング剤中の水酸基と粒子表面の活性基とが共有結合を形成し、免疫診断用抗体の配向性を向上させることから、シグナルを増強する効果が発現する。同様に、カルボキシル基、活性エステル基などの活性基を少なくとも表面に有する粒子に対して、アミノ基を有するブロッキング剤を共有結合させる方法や、アミノ基などの活性基を少なくとも表面に有する粒子に対して、活性エステル基を有するブロッキング剤を共有結合させる方法もシグナルを増強する方法として有効である。また、ブロッキング剤の脱離を抑制することができるため、界面活性剤などを含むバッファー類に対して、極めて安定性に富んだ検査試薬となる。

【0039】

本実施形態に係るブロッキング剤が特に良好な効果を発現する担体は、カルボキシル基を有する粒子(例えば磁性粒子)である。その好ましい処理方法としては、カルボキシル基を有する粒子を水溶性カルボジイミドなどで活性エステルとし、免疫診断プローブを結合した後、本実施形態に係るブロッキング剤(シグナル増強剤)で処理する方法が挙げられる。

【0040】

本実施形態に係るプローブ結合粒子は、上述のプローブ結合粒子の製造方法によって得ることができる。例えば、本実施形態に係るプローブ結合粒子は、上述のブロッキング剤を表面に有することができる。すなわち、本実施形態に係るプローブ結合粒子は、上記式(1)で示される官能基を有する。

【0041】

2. 実施例

以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらによって制限されるものではない。

【0042】

2.1. 実施例1

グリセロールメタクリレート95gおよびメチルメタクリレート5gを水167g、イソプロパノール333gの混合溶媒に溶解して攪拌機付きセパラブルフラスコに入れた。これに窒素を吹き込みながら、70℃まで昇温し、2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)ジハイドロクロライド0.2gを添加した後、4時間重合を続け、さらに80℃に昇温して2時間エージングした後、室温まで冷却した。得られた共重合体溶液を透析により精製し、さらに凍結乾燥することにより、本実施例のブロッキング剤(A-1)82gを得た。A-1に含まれる式(1)の官能基の濃度は、5.9mmol/gに相当する。液体クロマトグラフィーによる分子量分布は、分子量12,000をメインピークとするブロードなピークであった。

【0043】

カルボキシル基を有する磁性粒子(商品名「MAG1101」、JSR社製)1mgを分散させた固形分濃度1%の水分散体に、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塩(同仁化学社製)水溶液を添加して室温で2時間回転攪拌することにより、カルボキシル基を活性化した。これを磁気分離して上清を捨てた後、腫瘍マーカーであるヒトフェトプロテイン(以下、「AFP」という。)に対する抗体(以下、「抗A

10

20

30

40

50

F P 抗体」という。コスモ・バイオ株式会社製) 10 μ g を加え 15 時間室温で反応した。反応後、ブロッキング剤 (A - 1) の 0.4% 水溶液 125 μ L を加え、さらに 1 時間室温で攪拌した。これを磁気分離し、洗浄液 (25 mmol/L Tris - HCl, pH 7.4, 0.01% Tween 20 含有) で繰り返し洗浄した後、粒子濃度 0.5% になるように洗浄液で希釈し、一次プローブとして抗 AFP 抗体を結合したタンパク結合粒子 (免疫検査用粒子) を得た。得られた免疫検査用粒子の分散液 10 μ l (粒子 50 μ g 相当) をテストチューブに取り、ウシ胎児血清 (FCS) で 100 ng/mL に希釈した AFP 抗原 (日本バイオテスト社製) の標準検体 50 μ l と混合し、37 °C で 10 分間反応させた。磁気分離して粒子を分離し上清を除いた後、2 次抗体としてアルカリフォスファターゼ (以下、「ALP」という。) で標識した抗 AFP 抗体 (富士レピオ株式会社製、ルミパルス AFP - N に付属の試薬を使用) 40 μ l を添加し、37 °C で 10 分間反応させた。次いで、磁気分離し上清を除いた後、PBS で 3 回洗浄を繰り返して得られた粒子を 50 μ l の 0.01% Tween 20 に分散させ、新しいチューブに移し替えた。ALP の基質液 (ルミパルス基質液: 富士レピオ株式会社製) 100 μ l を加え、37 °C で 10 分間反応させた後、化学発光量を測定することによりシグナル強度を得た。化学発光量の測定には、ベルトルジャパン株式会社製の化学発光測定装置 (商品名「Lumat LB9507」) を用いた。その結果、シグナル強度は 126, 377 RIU であった。

10

【0044】

また、上記ウシ胎児血清 (FCS) で 100 ng/mL に希釈した AFP 抗原の標準検体 50 μ l の代わりに、AFP 抗原を含まない FCS 50 μ l を用いた以外は、上記と同様にして化学発光量を測定することにより得られたノイズ強度は、65 RIU であった。

20

【0045】

2.2. 比較例 1

実施例 1 において、グリセロールメタクリレートの代わりにポリエチレングリコールメタクリレートを使用した以外は、実施例 1 と同様にして、上記式 (1) で示される官能基を有さないブロッキング剤を得た。本比較例で得られたブロッキング剤の液体クロマトグラフィーによる分子量分布は、分子量 24,000 をメインピークとするブロードなピークであった。また、本比較例で得られたブロッキング剤を用いて、実施例 1 と同様の方法にて磁性粒子を処理して、シグナル強度およびノイズ強度を求めた。その結果、シグナル強度は、109, 033 RIU であり、ノイズ強度は、103 RIU であった。

30

【0046】

2.3. 比較例 2

実施例 1 において、ブロッキング剤 (A - 1) の代わりに牛血清アルブミンを使用した以外は、実施例 1 と同様の方法にて磁性粒子を処理して、シグナル強度およびノイズ強度を求めた。その結果、シグナル強度は、97, 625 RIU であり、ノイズ強度は、85 RIU であった。

【0047】

2.4. 比較例 3

実施例 1 において、ブロッキング剤 (A - 1) を使用しなかった以外は、実施例 1 と同様の方法にて磁性粒子を処理して、シグナル強度およびノイズ強度を求めた。その結果、シグナル強度は、94, 753 RIU であり、ノイズ強度は、121 RIU であった。

40

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平11-287802(JP,A)
特開平10-073591(JP,A)
特開平06-174726(JP,A)
特表2005-526972(JP,A)
特開平11-337552(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98