

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年3月31日(31.03.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/065052 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 16/00 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/033154

(22) 国際出願日: 2021年9月9日(09.09.2021)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2020-160026 2020年9月24日(24.09.2020) JP
特願 2020-160038 2020年9月24日(24.09.2020) JP

(71) 出願人: 株式会社 J V C ケンウッド (JVCKENWOOD CORPORATION) [JP/JP];
〒2210022 神奈川県横浜市神奈川区守屋町
3丁目12番地 Kanagawa (JP).

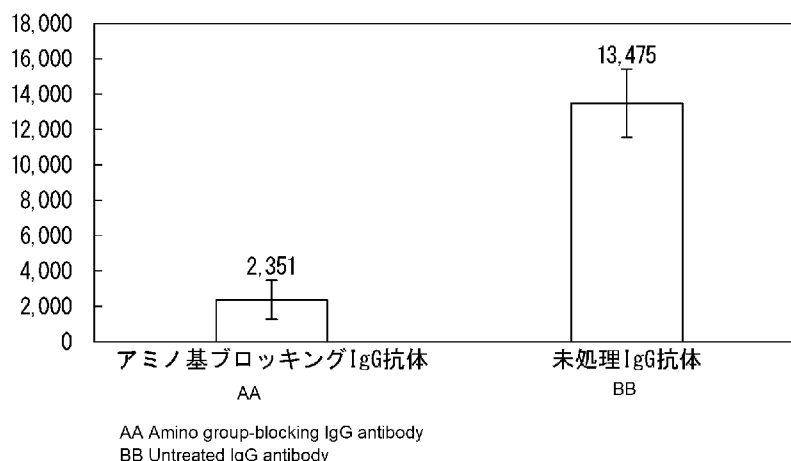
(72) 発明者: 小野 雅之(ONO Masayuki); 〒2210022
神奈川県横浜市神奈川区守屋町3丁目12
番地 株式会社 J V C ケンウッド 知的財産部
内 Kanagawa (JP). 糸長 誠(ITONAGA Makoto);
〒2210022 神奈川県横浜市神奈川区守屋町3丁
目12番地 株式会社 J V C ケンウッド 知的財
産部内 Kanagawa (JP). 堀越 勝恵(HORIKOSHI
Katsue); 〒2210022 神奈川県横浜市神奈川区守
屋町3丁目12番地 株式会社 J V C ケンウ
ッド 知的財産部内 Kanagawa (JP). 川上 達矢
(KAWAKAMI Tatsuya); 〒2210022 神奈川県横
浜市神奈川区守屋町3丁目12番地 株式会社 J
V C ケンウッド 知的財産部内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 松沼 泰史, 外(MATSUNUMA Yasushi
et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一
丁目9番2号 Tokyo (JP).

(54) **Title:** CAPTURE ANTIBODY, SOLID-PHASE CARRIER, DETECTION ANTIBODY, SOLID-PHASE CARRIER PARTICLES, AND KIT AND METHOD FOR MEASURING DETECTION TARGET SUBSTANCE

(54) 発明の名称: 捕捉用抗体、固相担体、検出用抗体、固相担体粒子、並びに検出対象物質の測定キット及び測定方法

[図8]



(57) **Abstract:** Provided is a capture antibody which is immobilized on a solid-phase carrier and used for capturing a detection target substance, wherein at least a portion of a functional group of a first antibody having a specific binding activity to the detection target substance is blocked by a compound capable of binding to the functional group. Provided is a detection antibody which is immobilized on solid-phase carrier particles and used for detecting a detection target substance, wherein at least a portion of a functional group of a second antibody having a specific binding activity to the detection target substance is blocked by a compound capable of binding to the functional group. Also, provided is a kit for measuring a detection target substance, the kit including the capture antibody and/or detection antibody. Also, provided is a method for measuring a detection target substance, by using the capture antibody and/or detection antibody.

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

(57) 要約: 固相担体に固定して検出対象物質を捕捉するために用いる捕捉用抗体であって、前記検出対象物質に対する特異的結合活性を有する第1の抗体の官能基の少なくとも一部が前記官能基に結合可能な化合物によりブロックされている、捕捉用抗体。固相担体粒子に固定して検出対象物質を検出するために用いる検出用抗体であって、前記検出対象物質に対する特異的結合活性を有する第2の抗体の官能基の少なくとも一部が前記官能基に結合可能な化合物によりブロックされている、検出用抗体。また、前記捕捉用抗体及び／又は検出用抗体を含む、検出対象物質の測定キット。また前記捕捉用抗体及び／又は検出用抗体を用いた検出対象物質の測定方法。

明 細 書

発明の名称：

捕捉用抗体、固相担体、検出用抗体、固相担体粒子、並びに検出対象物質の測定キット及び測定方法

技術分野

[0001] 本発明は、捕捉用抗体、固相担体、検出用抗体、固相担体粒子、並びに検出対象物質の測定キット及び測定方法に関する。

本願は、2020年9月24日に、日本に出願された特願2020-160026号及び特願2020-160038に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] サンドイッチイムノアッセイ等の免疫化学的測定法では、ウェルプレート等の固相担体に、検出対象物質に特異的に結合する捕捉用抗体を固定し、前記捕捉用抗体に検出対象物質を捕捉させる。次いで、前記検出対象物質に特異的に結合する標識抗体を結合させ、標識を検出することにより、検出対象物質を検出する。免疫化学的測定方法では、非特異的な結合は誤シグナルの要因となるため、低減することが求められる。

[0003] 固相担体表面に対する非特異的結合を低減する手段としては、検出対象物質に影響がないようなタンパク質（カゼイン、アルブミンなど）で、固相担体表面をブロッキングする方法が採用されている（図1A参照）。

[0004] 近年、分析機器及び試薬などの改良により、分析の高精度化及び高感度化が進んでいる。それにより、非常に少ない量の検出対象物質の差を検出できるようになってきた（特許文献1）。そのような高精度な分析機器を使用することで、固相担体表面に結合させた捕捉用抗体に対する抗原及び標識体の非特異的結合が誤シグナルとして検出されることが明らかになってきた（図1B、1C参照）。標識抗体として、検出対象物質に特異的に結合する検出用抗体を固相担体粒子に固定し、前記検出用抗体に検出対象物質を捕捉させ

る場合も、固相担体粒子表面に結合させた検出用抗体に対する抗原及び標識体の非特異的結合が誤シグナルとして検出されることがある。

[0005] 捕捉用抗体及び検出用抗体に対する非特異的結合を低減する手段として、ペプシン等のタンパク質分解酵素によりFc領域を切断して得られるF(a b')₂を、捕捉用抗体及び検出用抗体として用いる方法がある。しかしながら、Fc領域の切断は、抗体の構造を大きく変化させるため、抗体の性能が低下したり、保存安定性が低下したりするなどの不具合が生じる場合がある。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2017-207289号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 捕捉用抗体及び検出用抗体に対する非特異的結合は、特に、検出対象物質が低濃度である場合に問題となる。低濃度の検出対象物質を高精度に分析するためには、捕捉用抗体及び検出用抗体に対する特異的結合を簡便に低減する手法が求められる。

[0008] そこで、本発明は、非特異的結合が低減された捕捉用抗体、前記捕捉用抗体が固定された固相担体、非特異的結合が低減された検出用抗体、前記検出用抗体が固定された固相担体粒子、並びに前記固相担体又は前記固相担体粒子を用いた検出対象物質の測定キット及び測定方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明は以下の態様を含む。

[1] 固相担体に固定して検出対象物質を捕捉するために用いる捕捉用抗体であって、前記検出対象物質に対する特異的結合活性を有する第1の抗体の官能基の少なくとも一部が前記官能基に結合可能な化合物によりブロックさ

れている、捕捉用抗体。

〔２〕前記官能基がアミノ基である、〔１〕に記載の捕捉用抗体。

〔３〕〔１〕又は〔２〕に記載の捕捉用抗体が固定された固相担体。

〔４〕固相担体粒子に固定して検出対象物質を検出するために用いる検出用抗体であって、前記検出対象物質に対する特異的結合活性を有する第２の抗体の官能基の少なくとも一部が前記官能基に結合可能な化合物によりブロックされている、検出用抗体。

〔５〕前記官能基がアミノ基である、〔４〕に記載の検出用抗体。

〔６〕〔４〕又は〔５〕に記載の検出用抗体が固定された固相担体粒子。

〔７〕〔３〕に記載の固相担体と、前記検出対象物質に対する特異的結合活性を有する検出用抗体と、を含む、検出対象物質の測定キット。

〔８〕前記検出用抗体が、〔４〕又は〔５〕に記載の検出用抗体である、〔７〕に記載の検出対象物質の測定キット。

〔９〕〔６〕に記載の固相担体粒子を含む、〔８〕に記載の検出対象物質の測定キット。

〔１０〕〔３〕に記載の固相担体に固定された前記捕捉用抗体に、試料を接触させる工程（ｉ）と、前記捕捉用抗体に捕捉された前記検出対象物質を測定する工程（ｉｉ）と、を含む、検出対象物質の測定方法。

〔１１〕前記工程（ｉｉ）が、前記試料を接触させた捕捉用抗体に、〔６〕に記載の固相担体粒子を接触させる工程と、前記固相担体に捕捉された前記固相担体粒子を測定することにより、前記固相担体に捕捉された前記検出対象物質を測定する工程と、を含む、〔１０〕に記載の検出対象物質の測定方法。

発明の効果

〔００１０〕 本発明によれば、非特異的結合が低減された捕捉用抗体、前記捕捉用抗体が固定された固相担体、非特異的結合が低減された検出用抗体、前記検出用抗体が固定された固相担体粒子、並びに前記固相担体又は前記固相担体粒子を用いた検出対象物質の測定キット及び測定方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0011] [図1A]ブロッキング剤により固相担体に対する非特異的結合が抑制されることを説明する模式図である。

[図1B]捕捉用抗体に対する試料中物質の非特異的結合を説明する模式図である。

[図1C]捕捉用抗体に対する標識体の非特異的結合を説明する模式図である。

[図2]抗体の模式図を示す。

[図3]固相担体の一例である分析用基板の上面図である。

[図4]図3の分析用基板に固相担体粒子が捕獲されている状態を拡大して示す模式図である。

[図5]図3の分析用基板上で、固相担体粒子が検出対象物質と特異的に結合している状態を拡大して示す模式図である。

[図6]アミノ基をブロックした捕捉用抗体（アミノ基ブロッキングCD9抗体、アミノ基ブロッキングCD63抗体）を用いて、エクソソームを測定した結果を示す。

[図7]アミノ基をブロックしていない未処理の捕捉用抗体（未処理CD9抗体、未処理CD63抗体）を用いて、エクソソームを測定した結果を示す。

[図8]アイソタイプコントロールIgG抗体を捕捉用抗体として用いて、エクソソームを測定した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、場合により図面を参照しつつ、本発明の実施形態について詳細に説明する。図面中、同一又は相当部分には同一又は対応する符号を付し、重複する説明は省略する。各図における寸法比は、説明のため誇張している部分があり、必ずしも実際の寸法比とは一致しない。

[0013] 「抗体」とは、抗原結合活性を有する免疫グロブリンを意味する。抗体は、抗原結合活性を有していれば、インタクトな抗体である必要はなく、抗原結合断片であってもよい。本明細書において、「抗体」という用語は、抗原結合断片を包含する。「抗原結合断片」とは、抗体の一部を含むポリペプチ

ドであって、元の抗体の抗原結合性を維持しているポリペプチドである。抗原結合断片は、元の抗体の6つの相補性決定領域 (complementarity determining region: CDR) を全て含むものが好ましい。すなわち、重鎖可変領域のCDR1、CDR2、CDR3、並びに軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、CDR3を全て含むことが好ましい。抗原結合断片としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、可変領域断片(Fv)、ジスルフィド結合Fv、一本鎖Fv(scFv)、sc(Fv)₂等が挙げられる。

[0014] 抗体は、いずれの生物に由来するものであってもよい。抗体が由来する生物としては、例えば、哺乳類（ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ウマ、ウシ、ブタ、サル、イヌ等）、鳥類（ニワトリ、ダチョウ）等が挙げられるが、これらに限定されない。

抗体は、免疫グロブリンのいずれのクラス及びサブクラスであってもよい。抗体は、モノクローナル抗体であってもよく、ポリクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。

抗体は、免疫法、ハイブリドーマ法、ファージディスプレイ法等の公知の方法により作製することができる。

[0015] 「を含む」(comprise)という用語は、対象となる構成要素以外の構成要素を含んでいてもよいことを意味する。「からなる」(consist of)という用語は、対象となる構成要素以外の構成要素を含まないことを意味する。「から本質的になる」(consist essentially of)という用語は、対象となる構成要素以外の構成要素を特別な機能を発揮する態様（発明の効果を完全に喪失させる態様など）では含まないことを意味する。本明細書において、「を含む」(comprise)と記載する場合、「からなる」(consist of)態様、及び「から本質的になる」(consist essentially of)態様を包含する。

[0016] タンパク質（抗体を含む）、及び細胞は、単離されたものであり得る。「

単離された」とは、天然状態から分離された状態を意味する。本明細書に記載されるタンパク質、及び細胞は、単離されたタンパク質、及び単離された細胞であり得る。

[0017] <捕捉用抗体>

一実施形態において、本発明は、固相担体に固定して検出対象物質を捕捉するために用いる捕捉用抗体を提供する。本実施形態の捕捉用抗体は、前記検出対象物質に対する特異的結合活性を有する第1の抗体の官能基の少なくとも一部が、前記官能基に結合可能な化合物によりブロックされているものである。

[0018] 「捕捉用抗体」とは、免疫化学的測定法において、試料中の検出対象物質を捕捉ために使用される抗体である。「免疫化学的測定法」とは、抗体と抗原との抗原抗体反応を利用して、試料中の検出対象物質を測定する方法である。捕捉用抗体は、固相担体に固定して用いられる。固相担体に固定された捕捉用抗体に、検出対象物質を含有する試料を接触させると、検出対象物質が捕捉用抗体に結合し、捕捉用抗体を介して、検出対象物質が固相担体に捕捉される。捕捉用抗体が固定される固相担体は、特に限定されず、免疫化学的測定法に通常用いられる任意の固相担体を用いることができる。固相担体としては、例えば、ウェルプレート、ビーズ、基板、メンブレン、免疫化学的測定装置に付属する反応チャンバ等が挙げられる。固相担体は、後述の固相担体粒子であってもよい。

[0019] (第1の抗体)

捕捉用抗体に用いる抗体（以下、「第1の抗体」という）は、検出対象物質に対する特異的結合活性を有する抗体である。「検出対象物質に対する特異的結合活性を有する」とは、検出対象物質に対して高い結合活性を有し、他の物質に対してはほとんど結合活性を有しないことを意味する。

[0020] 「検出対象物質」は、免疫化学的測定法の測定対象となる物質を意味する。検出対象物質は、特に限定されず、抗原抗体反応が生じる物質であればよい。検出対象物質としては、例えば、タンパク質、ペプチド、糖鎖、脂質、

並びに前記の生体物質を発現する細胞、ウイルス及び細胞外小胞等が挙げられるが、これらに限定されない。細胞外小胞は、細胞が放出する小胞である。細胞外小胞の大きさは直径30nm～1μm程度である。細胞外小胞としては、エクソソーム、アポトーシス小体、マイクロベシクル等が挙げられる。

[0021] 検出対象物質が、細胞外小胞である場合、第1の抗体は、汎細胞外小胞膜タンパク質に特異的に結合する抗体であってもよい。ここで、「汎細胞外小胞膜タンパク質」とは、細胞外小胞がユビキタスに有する膜タンパク質をいう。汎細胞外小胞膜タンパク質は、エクソソーム、アポトーシス小体、及びマイクロベシクル等の細胞外小胞全般が、ユビキタスに有する膜タンパク質であってもよく、エクソソーム、アポトーシス小体、及びマイクロベシクルのいずれかで、通常発現される膜タンパク質であってもよい。例えば、汎細胞外小胞膜タンパク質は、エクソソームがユビキタスに有する膜タンパク質（以下、「汎エクソソーム膜タンパク質」ともいう）であることができる。

「細胞外小胞がユビキタスに有する」とは、広範な種類の細胞外小胞が有していることをいう。「エクソソームがユビキタスに有する」とは、広範な種類のエクソソームが有していることをいう。汎エクソソーム膜タンパク質としては、例えば、CD9、CD63、及びCD81等が挙げられる。検出対象物質がエクソソームである場合、第1の抗体は、CD9、CD63、又はCD81に対して特異的な結合活性を有する抗体であってもよい。

[0022] あるいは、検出対象物質が、細胞外小胞である場合、第1の抗体は、検出対象となる細胞外小胞に特異的に発現する膜タンパク質に対して、特異的結合活性を有するものであってもよい。例えば、検出対象物質が、がん細胞由来の細胞外小胞である場合、第1の抗体は、当該細胞外小胞が特異的に発現する膜タンパク質に対する特異的結合活性を有するものであってもよい。

[0023] 第1の抗体は、抗原結合領域（例えば、CDR）において、後述のブロック対象となる官能基を有するアミノ酸残基の数が少ないことが好ましい。例えば、第1の抗体は、第1級アミノ基を側鎖に有するリジン残基の数が、C

D Rにおいて少ないことが好ましい。C D Rにおけるリジン残基の数は、特に限定されないが、例えば、6つのC D R全体で0～10個、0～9個、0～8個、0～7個、0～6個、0～5個、0～4個、0～3個、0～2個、0～1個、又は0個とすることができる。

[0024] (ブロック剤：官能基に結合可能な化合物)

本実施形態の捕捉用抗体は、第1の抗体の官能基の少なくとも一部がブロックされているものである。「官能基がブロックされている」とは、官能基にブロック剤が結合し、反応性が失われていることを意味する。「ブロック剤」は、官能基に結合可能な化合物であり、官能基に結合した状態で、非特異的結合が低減された置換基を形成可能な化合物が好ましい。また、ブロック剤は、第1の抗体の三次構造を変化させず、第1の抗体の抗原結合性を変化させない化合物が好ましい。そのため、ブロック剤は、比較的低分子の化合物であることが好ましい。ブロック剤の分子量としては、例えば、1000以下が挙げられる。ブロック剤の分子量としては、例えば、900以下、800以下、700以下、600以下、又は500以下等が挙げられる。ブロック剤の分子量の下限は、特に限定されず、例えば、30以上、又は50以上等が挙げられる。

[0025] ブロック剤でブロックされる官能基は、抗体を構成するアミノ酸残基の側鎖に含まれる官能基、又はポリペプチド鎖の末端の官能基である。前記官能基としては、アミノ基、チオール基、カルボキシ基等が挙げられる。これらの官能基は、試料中の物質又は標識体と反応し、非特異的結合の要因となる。これらの官能基をブロック剤でブロックすることにより、免疫化学的測定法を実施した場合に、元の第1の抗体と比較して、非特異的結合を低減することができる。第1の抗体が有する官能基の中でも、特に非特異的結合に寄与する官能基としては、アミノ基（特に、第1級アミノ基（ $-NH_2$ ））が挙げられる。そのため、ブロック剤でブロックされる官能基は、アミノ基を含むことが好ましい。ブロックされる官能基は、1種であってもよく、2種以上であってもよい。

[0026] 側鎖にアミノ基を有するアミノ酸残基としては、例えば、リジン残基が挙げられる。ブロックされるアミノ基の位置は、特に限定されず、第1の抗体のアミノ酸配列に依存する。ブロックされるアミノ基の位置としては、ポリペプチド鎖のN末端のアミノ基、リジン残基の側鎖のアミノ基が挙げられる。アミノ基の位置は、重鎖でもよく、軽鎖でもよく、可変領域であってもよく、定常領域であってもよい。結合性に影響を与えない観点から、アミノ基の位置は、定常領域又はフレームワーク領域が好ましく、定常領域がより好ましい（図2参照）。

[0027] 本実施形態の捕捉用抗体では、ブロック対象となる官能基の少なくとも一部がブロックされていればよい。少なくとも一部の官能基がブロックされていれば、元の第1の抗体と比較して、非特異的結合が低減される。本実施形態の捕捉用抗体では、ブロック対象となる官能基の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、又は100%がブロックされたものであってよい。ここで、「ブロック対象の官能基」とは、使用したブロック剤が結合可能な官能基である。例えば、ブロック対象の官能基がアミノ基である場合、第1の抗体に含まれるアミノ基の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、又は100%がブロックされたものであってよい。

[0028] ブロック剤は、ブロック対象とする官能基の種類に応じて適宜選択することができる。ブロック剤は、例えば、ブロック対象とする官能基と結合し得る官能基を有する化合物である。

例えば、ブロック対象とする官能基がアミノ基である場合、アミノ基に対する公知のブロック剤を特に制限なく用いることができる。アミノ基に対するブロック剤としては、例えば、カルボキシ基を有する化合物が挙げられる。カルボキシ基を有する化合物としては、カルボン酸、主鎖末端にカルボキシ基を有する樹脂等が挙げられる。ブロック剤が含むカルボキシ基の数は、特に限定されないが、非特異的結合を低減する観点から、1個であることが好ましい。アミノ基に対するブロック剤は、カルボキシ基以外の反応性官能

基を有さないことが好ましく、特にアミノ基を有さないことが好ましい。

[0029] ブロック剤として使用可能なカルボン酸としては、モノカルボン酸が好ましく、例えば、飽和脂肪酸（ギ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、カプロン酸等）、不飽和脂肪酸（アクリル酸、メタクリル酸、ソルビン酸、オレイン酸等）、ヒドロキシカルボン酸（乳酸等）、芳香族カルボン酸（安息香酸、サリチル酸等）、飽和脂肪族カルボン酸（コール酸、デオキシコール酸、ビオチン等）等が挙げられるが、これらに限定されない。ブロック剤として使用するカルボン酸は、ビオチンを除くカルボン酸であってもよい。ブロック剤として使用するカルボン酸は、前記例示したカルボン酸の1種以上が除外されてもよい。

ブロック剤として使用可能な、カルボキシ基を主鎖末端に含む樹脂としては、例えば、ポリエーテル、ポリスチレン、ポリオレフィン等の各種樹脂の主鎖末端にカルボキシ基が付加されたもの、及びポリエステル等が挙げられるが、これらに限定されない。ブロック剤が樹脂である場合、前記分子量は、サイズ排除クロマトグラフィーにより測定される標準ポリスチレン換算の数平均分子量を意味する。

[0030] 第1の抗体の官能基をブロック剤でブロックする方法は、官能基及びブロック剤の種類に応じて、適宜選択することができる。官能基がアミノ基であり、ブロック剤がカルボキシ基を有する化合物である場合、第1の抗体とブロック剤とを混合し、カルボジイミド等の適切な縮合剤の存在下で、アミド結合形成反応を行う。これにより、第1の抗体に含まれるアミノ基をブロックすることができる。このとき、使用するブロック剤の量を調整することにより、ブロックされるアミノ基の割合を調整することができる。

[0031] 本実施形態に係る捕捉用抗体は、官能基がブロックされているため、免疫化学的測定方法において、捕捉用抗体に対する非特異的結合を低減することができる。また、本実施形態に係る捕捉用抗体は、ブロック剤を反応させるという簡易な方法で調製することができる。さらに、本実施形態の捕捉用抗体は、Fc領域を含んでいても非特異的結合を低減できるため、非特異的結

合の低減のためにFc除去処理を行う必要がない。

[0032] <固相担体>

一実施形態において、本発明は、前記実施形態の捕捉用抗体が固定された固相担体を提供する。

[0033] 固相担体は、特に限定されず、免疫化学的測定法に一般的に用いられる固相担体を特に制限なく使用することができる。固相担体は、例えば、ウェルプレート、ビーズ、基板、メンブレン、免疫化学的測定装置に付属する反応チャンバ等であってもよい。

[0034] 固相担体の材質は、特に限定されず、固相担体の種類に応じて適宜選択することができる。固相担体の材質としては、例えば、ポリスチレン、ポリオレフィン（ポリエチレン、ポリプロピレン等）、シクロオレフィンポリマー、ポリカーボネート等の樹脂；ガラス；金、鉄、ジルコニア等の金属又は酸化金属等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0035] 固相担体への捕捉用抗体の固定は、固相担体の種類に応じて、公知の方法を用いて行うことができる。例えば、捕捉用抗体を固定する面を、表面疎水的相互作用によりタンパク質が物理吸着されるように表面加工してもよい。

[0036] 本実施形態の固相担体は、免疫化学的測定法において、試料中の検出対象物質を捕捉するために用いることができる。上記実施形態の捕捉用抗体を固相担体に固定することで、捕捉用抗体に対する非特異的結合が低減された固相担体を提供することができる。

[0037] <検出対象物質の測定キット>

一実施形態において、本発明は、検出対象物質の測定キットを提供する。本実施形態の測定キットは、前記実施形態の固相担体と、前記検出対象物質に対する特異的結合活性を有する検出用抗体とを含む。

[0038] 本実施形態の測定キットは、免疫化学的測定方法により、試料中の検出物質を測定するために用いることができる。本実施形態の測定キットは、例えば、サンドイッチイムノアッセイ用キットとして用いることができる。

[0039] (固相担体)

固相担体は、前記実施形態の固相担体を用いることができる。

[0040] (検出用抗体)

「捕捉用抗体」とは、免疫化学的測定法において、試料中の検出対象物質の検出のために使用される抗体である。検出用抗体は、例えば、標識物質を結合して用いられる。捕捉用抗体に捕捉された検出対象物質に、検出用抗体を接触させると、検出用抗体が検出対象物質に結合する。検出用抗体に標識物質が結合している場合、標識物質を介して、検出対象物質を検出することができる。検出用抗体に標識物質が結合されていない場合、検出用抗体に標識物質含有化合物を結合させる反応を行ってもよい。検出用抗体は、後述の固相担体粒子に固定されてもよい。

[0041] 検出用抗体は、第2の抗体を含む。第2の抗体は、検出対象物質に対する特異的結合活性を有する抗体である。第2の抗体は、第1の抗体と同じであってもよく、異なってもよいが、異なっていることが好ましい。第2の抗体は、検出対象物質を検出するための検出用抗体として用いられる。

例えば、検出対象物質が、タンパク質、ペプチド、糖鎖、脂質等の化合物である場合、第2の抗体は、第1の抗体のエピトープ（第1のエピトープ）とは異なるエピトープ（第2のエピトープ）で、検出対象物質に特異的に結合する抗体であってもよい。

例えば、検出対象物質が、細胞、ウイルス又は細胞外小胞等である場合、第2の抗体は、第1の抗体が結合する膜タンパク質（第1の膜タンパク質）とは異なる膜タンパク質（第2の膜タンパク質）に特異的に結合する抗体であってもよい。

[0042] 例えば、検出対象物質がエクソソームである場合、第1の抗体は、汎エクソソーム膜タンパク質のいずれか（第1の汎エクソソーム膜タンパク質）に対して特異的結合活性を有し、第2の抗体は、前記第1の汎エクソソーム膜タンパク質とは異なる汎エクソソーム膜タンパク質（第2の汎エクソソーム膜タンパク質）に対して特異的結合活性を有していてもよい。あるいは、第1の抗体は、汎エクソソーム膜タンパク質のいずれかに対して特異的結合活

性を有し、第2の抗体は、検出対象とするエクソソームに特異的に発現する膜タンパク質に対して特異的結合活性を有していてもよい。逆に、第1の抗体は、検出対象とするエクソソームに特異的に発現する膜タンパク質に対して特異的結合活性を有し、第2の抗体は、汎エクソソーム膜タンパク質のいずれかに対して特異的結合活性を有していてもよい。

[0043] 第2の抗体は、第1の抗体と同様に、官能基がブロックされていてもよい。ブロックされる官能基としては、第1の抗体と同様のものが挙げられる。ブロックされる官能基としては、アミノ基（特に第1級アミノ基）を含むことが好ましい。ブロック剤は、第1の抗体と同様のものを用いることができる。第2の抗体の官能基をブロックすることにより、第2の抗体に対する非特異的結合を低減することができる。

[0044] 第2の抗体は、標識物質が結合したものであってもよい。標識物質は、特に限定されず、免疫化学的測定法に通常用いられる標識物質を特に制限なく用いることができる。標識物質としては、例えば、固相担体粒子（ポリスチレン、グリシジルメタクリレート等の樹脂ビーズ；磁気ビーズ；金属ナノ粒子等）、ペルオキシダーゼ（例、西洋ワサビペルオキシダーゼ）、アルカリホスファターゼなどの酵素標識；カルボキシフルオレセイン（FAM）、6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン（JOE）、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、テトラクロロフルオレセイン（TET）、5'-ヘキサクロロフルオレセイン-Cy3ホスホロアミダイト（HEX）、Cy3、Cy5、Alexa568、Alexa647などの蛍光標識；ヨウ素125などの放射性同位体標識；ルテニウム錯体などの電気化学発光標識；ビオチン等が挙げられる。第2の抗体に対する標識物質の結合は、公知の方法により行うことができる。

[0045] （任意構成）

本実施形態の測定キットは、上記構成に加えて、任意の構成を含んでいてもよい。任意の構成としては、例えば、試料を処理するための試薬（例えば、希釈液等）、洗浄液、ブロッキング液、緩衝液等の各種試薬類、及び使用

説明書等が挙げられる。

[0046] 第2の抗体が標識物質で標識化されていない場合、本実施形態の測定キットは、さらに、第2の抗体に特異的に結合する第3の抗体を含んでいてもよい。第3の抗体は、例えば、第2の抗体のFc領域に結合する抗体であってもよい。第3の抗体を用いる場合、第1の抗体、第2の抗体、及び第3の抗体は、それぞれ異なる生物に由来する抗体であることが好ましい。

第3の抗体は、標識物質で標識化されたものを用いることができる。標識物質としては、第2の抗体の標識物質として挙げたものと同様のものが挙げられる。

[0047] 第3の抗体は、第1の抗体と同様に、官能基がブロックされていてもよい。ブロックされる官能基としては、第1の抗体と同様のものが挙げられる。ブロックされる官能基としては、アミノ基（特に第1級アミノ基）を含むことが好ましい。ブロック剤は、第1の抗体と同様のものを用いることができる。第3の抗体の官能基をブロックすることにより、第2の抗体に対する非特異的結合を低減することができる。

[0048] 第2の抗体又は第3の抗体が、標識物質で標識化されたものである場合、本実施形態の測定キットは、前記標識物質を検出するための検出試薬を含んでいてもよい。検出試薬は、標識物質の種類に応じて、公知のものを用いることができる。

[0049] 本実施形態の測定キットは、標準試薬を含んでいてもよい。標準試薬は、検出対象物質の検量線を作成するための試薬である。標準試薬は、例えば、検出対象物質と同種の精製物質を用いることができる。

[0050] 本実施形態の測定キットは、前記実施形態の固相担体を含むため、免疫化学的測定法を実施した場合に、捕捉用抗体に対する非特異的結合を低減することができる。そのため、検出対象物質が低濃度の場合であっても、高精度の測定を行うことができる。

[0051] <検出用抗体>

一実施形態において、本発明は、固相担体粒子に固定して検出対象物質を

検出するために用いる検出用抗体を提供する。本実施形態の検出用抗体は、前記検出対象物質に対する特異的結合活性を有する第2の抗体の官能基の少なくとも一部が、前記官能基に結合可能な化合物によりブロックされているものである。

[0052] 本実施形態の検出用抗体に用いる第2の抗体としては、上記で挙げたものと同様のものが挙げられる。ブロックされる官能基、及びブロック剤についても、上記と同様のものが挙げられる。

[0053] <固相担体粒子>

一実施形態において、本発明は、前記実施形態の検出用抗体が固定された固相担体粒子を提供する。

[0054] 固相担体粒子の材質としては、固相担体と同様のものが挙げられる。固相担体粒子への検出用抗体の固定は、固相担体粒子の種類に応じて、公知の方法を用いて行うことができる。例えば、物理吸着を利用する方法、アビジン-ビオチン結合を利用する方法等が挙げられる。固相担体粒子の粒子径は、例えば、1000nm以下が好ましく、1～500nmがより好ましく、10～300nmがさらに好ましく、10～200nmが特に好ましい。固相担体粒子は、ナノサイズ（1～1000nm）の粒径を有するナノ粒子であることが好ましい。

[0055] <検出対象物質の測定方法>

一実施形態において、本発明は、検出対象物質の測定方法を提供する。本実施形態の測定方法は、前記実施形態の固相担体に固定された捕捉用抗体に、試料を接触させる工程（以下、「工程（i）」という）と、前記捕捉用抗体に捕捉された前記検出対象物質を測定する工程（以下、「工程（ii）」という）と、を含む。

[0056] （工程（i））

工程（i）では、前記実施形態の固相担体に固定された捕捉用抗体に、試料を接触させる。

[0057] 試料は、特に限定されず、任意の試料を用いることができる。試料は、検

出対象物質を含有していると推定される液体試料であってもよい。試料は、例えば、体液試料（血液、血清、血漿、唾液、尿、涙、汗、乳汁、鼻汁、精液、胸水、消化管分泌液、脳脊髄液、組織間液、及びリンパ液等）、細胞培養液、細胞抽出液等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0058] 固相担体に固定された捕捉用抗体に、試料を接触させる方法は、特に限定されず、固相担体の種類に応じて、適宜選択することができる。例えば、捕捉用抗体が固定された固相担体の表面上に、試料を供給し、所定時間インキュベートしてもよい。インキュベート時間は、捕捉用抗体に、試料中の検出対象物質が結合するのに十分な時間であればよい。インキュベート時間としては、例えば、30分以上、1時間以上、又は2時間以上等が挙げられる。インキュベート時間の上限は、特に限定されないが、例えば、10時間以下、6時間以下、4時間以下、又は3時間以下等とすることができる。インキュベート温度は、捕捉用抗体に対する検出対象物質の結合反応が進行する温度であればよい。インキュベート温度としては、例えば、10～40℃、20～40℃、又は30～40℃等が挙げられる。捕捉用抗体と検出対象物質との反応効率を向上させるために、インキュベート中、固相担体を緩やかに振盪してもよい。

[0059] 試料を捕捉用抗体に接触させることにより、試料中の検出対象物質が、捕捉用抗体に結合して、固相担体上に捕捉される。一方、検出対象物質以外の物質は、捕捉用抗体に結合しないため、固相担体上に捕捉されない。

[0060] 捕捉用抗体に試料を接触させた後は、適宜、洗浄液を用いて固相担体の洗浄を行ってもよい。固相担体を洗浄することにより、捕捉用抗体に結合していない物質を除去することができる。洗浄液は、特に限定されず、免疫化学的測定法で一般的に使用される洗浄液を特に制限なく使用することができる。洗浄液としては、例えば、PBS、トリス緩衝液、HEPES緩衝液等の緩衝液；前記緩衝液にTween 20等の界面活性剤を添加したもの；及び純水等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0061] (工程 (i i))

工程（i i）では、捕捉用抗体に捕捉された検出対象物質を測定する。

[0062] 捕捉用抗体に捕捉された検出対象物質の測定方法は、特に限定されず、免疫化学的測定法に一般的に用いられる方法を特に制限なく用いることができる。検出対象物質の測定は、例えば、検出用抗体として、前記第2の抗体を用いて行ってもよい。第2の抗体に標識物質が結合している場合、前記標識物質のシグナルを検出することにより、検出対象物質を測定することができる。標識物質が結合していない第2の抗体を用いる場合、標識物質が結合した第3の抗体を用いてもよい。この場合も、標識物質のシグナルを検出することにより、検出対象物質を測定することができる。標識物質のシグナルの検出は、標識物質の種類に応じて、公知の方法により行うことができる。

[0063] 例えば、標識物質が酵素標識である場合、前記酵素標識の発色基質を添加して発色反応を行う。次いで、発色反応後に、反応液の吸光度等を測定することにより、検出対象物質を測定することができる。例えば、標識物質が蛍光標識である場合、蛍光強度を測定することにより、検出対象物質を測定することができる。標識物質が、固相担体粒子である場合、粒子カウンター又は顕微鏡観察等により、固相担体上に捕捉された固相担体粒子の数をカウントすることにより、検出対象物質を測定することができる。

[0064] 検出用抗体として第2の抗体を用いる場合、第2の抗体を、捕捉用抗体に結合した検出対象物質に接触させる。例えば、検出対象物質が捕捉された固相担体の表面上に、第2の抗体を含む溶液を供給し、所定時間インキュベートしてもよい。インキュベート時間は、第2の抗体が、検出対象物質に結合するのに十分な時間であればよい。インキュベート時間及びインキュベート温度としては、工程（i）で挙げたものと同様のものが挙げられる。第2の抗体と検出対象物質との反応効率を向上させるために、インキュベート中、固相担体を緩やかに振盪してもよい。

[0065] 検出対象物質に第2の抗体を接触させた後は、適宜、洗浄液を用いて固相担体の洗浄を行ってもよい。固相担体を洗浄することにより、検出対象物質に結合していない第2の抗体を除去することができる。洗浄液としては、工

程（i）で挙げたものと同様のものが挙げられる。

[0066] 第3の抗体を用いる場合、第3の抗体を、検出対象物質に結合した第2の抗体に接触させる。例えば、第2の抗体が捕捉された固相担体の表面上に、第3の抗体を含む溶液を供給し、所定時間インキュベートしてもよい。インキュベート時間は、第3の抗体が、第2の抗体に結合するのに十分な時間であればよい。インキュベート時間及びインキュベート温度としては、工程（i）で記載したものと同様のものが挙げられる。第3の抗体と第2の抗体との反応効率を向上させるために、インキュベート中、固相担体を緩やかに振盪してもよい。

[0067] 第2の抗体に第3の抗体を接触させた後は、適宜、洗浄液を用いて固相担体の洗浄を行ってもよい。固相担体を洗浄することにより、第2の抗体に結合していない第3の抗体を除去することができる。洗浄液としては、工程（i）で挙げたものと同様のものが挙げられる。

[0068] 工程（i i）は、前記試料を接触させた捕捉用抗体に、第2の抗体が固定された固相担体粒子を接触させる工程と、前記固相担体に捕捉された前記固相担体粒子を測定することにより、前記固相担体に捕捉された前記検出対象物質を測定する工程とを含んでもよい。

工程（i i）で用いてもよい第2の抗体及び第3の抗体は、官能基の少なくとも一部が前記官能基に結合可能な化合物によりブロックされたものであってもよい。

[0069] （任意工程）

本実施形態の測定方法は、上記工程に加えて、任意の工程を含んでもよい。任意の工程としては、例えば、ブロッキング工程が挙げられる。

[0070] 《ブロッキング工程》

本実施形態の測定方法は、工程（i）の前に、ブロッキング工程を含んでもよい。ブロッキング工程は、捕捉用抗体が固定された固相担体のブロッキング処理を行う工程である。ブロッキング処理を行うことにより、固相担体に対する非特異的結合を抑制することができる。

[0071] ブロッキング処理は、ブロッキング液を、捕捉用抗体が固定された固相担体に接触させることにより行うことができる。ブロッキング液は、特に限定されず、免疫化学的測定法に一般的に用いられるものを、特に制限なく使用することができる。ブロッキング液としては、例えば、1～5%程度のスキムミルク又は牛血清アルブミン（BSA）を含む緩衝液等が挙げられる。前記ブロッキング液用の緩衝液は、特に限定されないが、例えば、PBS、PBS-T、トリス緩衝液、HEPES緩衝液等が挙げられる。

[0072] 本実施形態の測定方法によれば、前記実施形態の固相担体を用いるため、捕捉用抗体に対する非特異的結合を低減することができる。そのため、試料中の検出対象物質が低濃度であっても、高精度に検出対象物質を測定することができる。

検出用抗体として、官能基の少なくとも一部が前記官能基に結合可能な化合物によりブロックされている第2の抗体を用いた場合、検出用抗体に対する非特異的結合も低減することができる。そのため、試料中の検出対象物質が低濃度であっても、高精度に検出対象物質を測定することができる。

[0073] （標識物質が固相担体粒子である場合の固相担体及び測定方法の具体例）

以下、標識物質が、固相担体粒子である場合の固相担体の具体例、及び前記固相担体を用いた検出対象物質の測定方法の具体例を記載するが、これに限定されない。

[0074] ≪固相担体の具体例≫

図3は、検出対象物質の測定装置に用いる固相担体の一例を示す。前記測定装置は、標識物質として固相担体粒子を用いるものであり、固相担体上に捕捉された固相担体粒子の数をカウントする機能を備える。図3は、前記のような測定装置に、固相担体として使用される分析用基板1の一例である。

[0075] 図3に示すように、分析用基板1は、例えば、ブルーレイディスク（BD）、DVD、コンパクトディスク（CD）等の光ディスクと同等の円板形状を有する。分析用基板1の中心部には位置決め孔2が形成されている。分析用基板1は、例えば、一般的に光ディスクに用いられるポリカーボネート樹

脂やシクロオレフィンポリマー等の樹脂材料で形成されている。なお、分析用基板 1 は、上記の光ディスクに限定されるものではなく、他の形態であってもよく、所定の規格に準拠した光ディスクを用いることもできる。図 4 に示すように、分析用基板 1 の表面には、凸部 3 と凹部 4 とが半径方向に交互に配置されたトラック領域 5 が形成されている。凸部 3 及び凹部 4 は、分析用基板 1 の内周部から外周部に向かってスパイラル状に形成されている。凹部 4（凸部 3）の半径方向のピッチであるトラックピッチ W_4 は例えば 320 nm である。分析用基板 1 のトラック領域 5 には反応領域 10 が形成されている。図 5 を用いて反応領域 10 の形成方法を説明する。

[0076] 検出対象物質 11 に対して特異的結合活性を有する捕捉用抗体 12 を、トラック領域 5 上の所定の領域（反応領域 10 が形成される領域）に固定する。例えば、捕捉用抗体 12 を含む緩衝液を分析用基板 1 と反応させる。反応後の緩衝液を除去した後、分析用基板 1 を洗浄して乾燥させることにより、捕捉用抗体 12 をトラック領域 5 上に固定させる。

[0077] <<測定方法の具体例>>

検出対象物質 11 をトラック領域 5 上に固定されている捕捉用抗体 12 と特異的に結合させる。例えば、検出対象物質 11 を含む試料液を捕捉用抗体 12 と反応させる。反応後の試料液を除去した後、分析用基板 1 を洗浄して乾燥させることにより、検出対象物質 11 をトラック領域 5 の凹部 4 に捕捉させる。検出対象物質 11 がエクソソームの場合、外径は例えば 100 nm 程度である。なお、試料液によっては検出対象物質 11 が含まれていない場合もあるが、説明を分かりやすくするために、以下に試料液に検出対象物質 11 が含まれている場合について説明する。

[0078] 検出対象物質 11 を標識するために、固相担体粒子 20 をトラック領域 5 上に捕捉されている検出対象物質 11 と特異的に結合させる。固相担体粒子 20 の表面には、検出対象物質 11 に対する特異的結合活性を有する第 2 の抗体 21 が固定されている。第 2 の抗体 21 が検出対象物質 11 と特異的に結合することにより、固相担体粒子 20 はトラック領域 5 の凹部 4 に捕捉さ

れる。これにより、検出対象物質 11 及び固相担体粒子 20 は、分析用基板 1 のトラック領域 5 の凹部 4 に捕捉される。検出対象物質 11 及び固相担体粒子 20 が捕捉されている領域が図 3 に示す反応領域 10 である。なお、図 3 では、分析用基板 1 の中心 C a に対して同一円周 C b 上に各反応領域 10 の中心がそれぞれ位置するように 8 つの反応領域 10 が等間隔に形成されているが、反応領域 10 の数や形成位置はこれに限定されるものではない。

[0079] 分析用基板 1 の反応領域 10 に捕捉された固相担体粒子 20 は、例えば、光ピックアップを備えた測定装置を用いて計数することができる。光ピックアップは、分析用基板 1 に向けてレーザ光を照射し、分析用基板 1 からの反射光を受光する。光ピックアップは、反射光の受光レベルを検出して受光レベル信号 J S を生成し、C P U 等を備えた制御部へ出力する。制御部では、光ピックアップから出力された受光レベル信号 J S から固相担体粒子検出信号 K S を抽出してカウントすることにより、反応領域 10 に捕捉されている固相担体粒子 20 を検出してカウントする。このような機構を備えた測定装置としては、例えば、特開 2017-207289 号公報に記載の分析装置が挙げられる。検出対象物質がエクソソームである場合、測定装置として、ExoCounter（登録商標）（JVC ケンウッド）等を用いることができる。

実施例

[0080] 以下、実施例により本発明を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

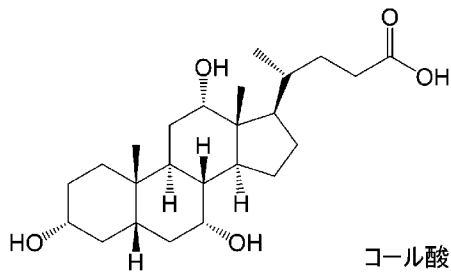
[0081] [実施例 1]

（捕捉用抗体の調製）

抗体として、CD9 又は CD63 に特異的に結合するモノクローナル抗体を用いた。CD9 及び CD63 は、エクソソーム汎用マーカーとして知られている。CD9 抗体は、エクソソームモノクローナル抗体 Anti-CD9（コスモ・バイオ社製）を用いた。CD63 抗体は、エクソソームモノクローナル抗体 Anti-CD63（コスモ・バイオ社製）を用いた。

[0082] CD9抗体又はCD63抗体のアミノ基に結合させる化合物として、コール酸を用いた。CD9抗体又はCD63抗体のアミノ基にコール酸を結合させることにより、アミノ基がブロッキングされ、非特異的結合が低減されることが考えられる。

[0083] [化1]



[0084] 50 μ g のCD9抗体又はCD63抗体、100 μ g のコール酸、及び800 μ g の1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド(EDC)を、400 μ L のリン酸緩衝生理食塩水に添加して混合し、室温で、2時間インキュベートした。反応後、反応液を限外濾過フィルター(カットオフ分子量50 kDa)で濾過して未反応のEDCを除去した。得られた濾物を緩衝液で洗浄した。これにより、CD9抗体又はCD63抗体のアミノ基ブロッキング抗体(アミノ基ブロッキングCD9抗体、アミノ基ブロッキングCD63抗体)を得た。前記アミノ基ブロッキング抗体では、CD9抗体又はCD63抗体のアミノ基にコール酸が結合している。

[0085] (捕捉用抗体の固相担体への固定)

固相担体として、ExoCounter(株式会社JVCケンウッド)に付属のカートリッジに設けられたウェルを用いた。上記で調製したアミノ基ブロッキングCD9抗体及びアミノ基ブロッキングCD63抗体を、捕捉用抗体としてウェルに固定した。

アミノ基ブロッキングCD9抗体又は抗CD69ブロッキング抗体を、5 μ g/mLとなるようにリン酸緩衝生理食塩水に溶解し、70 μ Lをディスクのウェルに注入した。37℃で、30分間インキュベートし、疎水吸着によりアミノ基ブロッキングCD9抗体又は抗CD69ブロッキング抗体をウ

エルに固定した。インキュベート後、ウェルを緩衝液で洗浄した。

[0086] (固相担体のブロッキング)

次いで、リン酸緩衝生理食塩水に溶解した1%BSA200 μ Lをウェルに注入し、37℃で、30分間インキュベートし、ウェル内のブロッキング処理を行った。インキュベート後、ウェルを緩衝液で洗浄した。

[0087] (エクソソームの検出)

結腸癌細胞株HCT116の培養液(10mL)から抽出したエクソソームを試料として用いた。エクソソームをリン酸緩衝生理食塩水に懸濁し、エクソソーム含有試料とした。また、エクソソームを含まない緩衝液をエクソソーム非含有試料とした。

[0088] アミノ基ブロッキングCD9抗体又はアミノ基ブロッキングCD63抗体を固定したウェルに、エクソソーム含有試料(エクソソームウェル)又はエクソソーム非含有試料(ブランクウェル)を50 μ L注入し、37℃で、2時間インキュベートした。インキュベート後、ウェルを緩衝液で洗浄した。この操作により、エクソソームウェルでは、アミノ基ブロッキングCD9抗体又はアミノ基ブロッキングCD63抗体にエクソソームが捕捉される。

[0089] 次いで、エクソソームウェル及びブランクウェルに、CD9抗体を固定したナノ粒子を1 μ g注入し、37℃で、1.5時間インキュベートした。インキュベート後、エクソソームウェル及びブランクウェルを洗浄し、ウェル内を乾燥させた。以上の操作により、エクソソームウェルでは、アミノ基ブロッキングCD9抗体又はアミノ基ブロッキングCD63抗体とエクソソームとCD9抗体結合ナノ粒子のサンドイッチ結合が形成される。一方、ブランクウェルでは、ナノ粒子の非特異的な吸着が形成される。

[0090] 次いで、カートリッジからウェルを分離し、試料分析用ディスクをExoCounterで測定し、ディスク表面に結合したナノ粒子の個数をカウントした。

[0091] (結果)

結果を図6に示す。アミノ基ブロッキングCD9抗体を固定したエクソソ

ームウェルのカウント値は、157, 750であった。これに対し、アミノ基ブロッキングCD9抗体を固定した空白ウェルのカウント値は7, 668であった。また、アミノ基ブロッキングCD63抗体を固定したエクソソームウェルのカウント値は、408, 672であった。これに対し、アミノ基ブロッキングCD63抗体を固定した空白ウェルのカウント値は7, 791であった。

[0092] [比較例1]

コール酸を結合させていないCD9抗体（未処理CD9抗体）又はCD63抗体（未処理CD63抗体）を捕捉用抗体としてウェルに固定したこと以外は、前記実施例1と同様の方法で、エクソソームの検出を行った。

[0093] 結果を図7に示す。未処理CD9抗体を固定したエクソソームウェルのカウント値は145, 358であった。これに対し、未処理CD9抗体を固定した空白ウェルのカウント値は11, 805であった。また、未処理CD63抗体を固定したエクソソームウェルのカウント値は、415, 382であった。これに対し、未処理CD63抗体を固定した空白ウェルのカウント値は17, 499であった。

[0094] 実施例1及び比較例1の結果から、CD9抗体及びCD63抗体のいずれにおいても、アミノ基ブロッキング抗体を捕捉用抗体として用いた場合（実施例1）は、未処理抗体を捕捉用抗体として用いた場合（比較例1）と比較して、空白ウェルのカウント値が低減された。この結果は、アミノ基ブロッキング抗体を捕捉用抗体として用いることにより、捕捉用抗体に対するCD9抗体固定ナノ粒子の非特異的結合が低減されることを示す。一方、エクソソームウェルでは、実施例1と比較例1とで、カウント値に大きな差は認められなかった。

[0095] [実施例2、比較例2]

（実施例2）

CD9抗体又はCD63抗体に替えて、アイソタイプコントロールIgG抗体（バイオレジェンド社製）を用いたこと以外は、前記実施例1と同様の

方法で、アミノ基ブロッキング抗体を調製した。これを実施例 2 の捕捉用抗体として用いた。

[0096] (比較例 2)

コール酸を結合させていないアイソタイプコントロール IgG 抗体を、比較例 2 の捕捉用抗体として用いた。

[0097] (捕捉用抗体の固相担体への固定)

実施例 2 の捕捉用抗体及び比較例 2 の捕捉用抗体を、それぞれ別のウェルに注入し、前記実施例 1 と同様の方法で、ウェルに固定した。

[0098] (エクソソームの検出)

前記実施例 1 と同様の方法で、ExoCounter を用いて、ディスク表面に結合したナノ粒子の個数をカウントした。試料は、エクソソーム含有試料を用いた。

[0099] (結果)

結果を図 8 に示す。アイソタイプコントロール IgG 抗体には、エクソソームが特異的に結合しないため、図 8 に示されるシグナルは、エクソソームが非特異的にウェルに吸着していることを意味する。実施例 2 のアミノ基ブロッキング IgG 抗体を固定したウェルのカウント値は 2, 351 であった。これに対し、比較例 2 の未処理 IgG 抗体のウェルのカウント値は 13, 475 であった。

[0100] 実施例 2 及び比較例 2 の結果から、アミノ基ブロッキング抗体を捕捉用抗体として用いた場合（実施例 2）は、未処理抗体を捕捉用抗体として用いた場合（比較例 2）と比較して、ウェル内への非特異的結合が低減されることが確認された。

[0101] 以上の結果から、抗原抗体反応を利用して検出対象物質の測定を行う免疫化学的測定方法において、アミノ基等の反応性官能基をブロッキング処理した捕捉用抗体を用いることで、捕捉用抗体に対する非特異的結合を低減できることが確認された。そのため、反応性官能基をブロッキング処理した捕捉用抗体を用いることにより、精度の高い測定を行うことが可能となる。

産業上の利用可能性

[0102] 本発明によれば、非特異的結合が低減された捕捉用抗体、前記捕捉用抗体が固定された固相担体、非特異的結合が低減された検出用抗体、前記検出用抗体が固定された固相担体粒子、並びに前記固相担体又は前記固相担体粒子を用いた検出対象物質の測定キット及び測定方法が提供される。

[0103] 以上、本発明の好ましい実施形態を説明および図示してきたが、これらは本発明を例示するものであり、限定的なものとはみなされるべきではないことを理解すべきである。本発明の精神または範囲から逸脱することなく、追加、省略、置換、およびその他の変更を行うことができる。したがって、本発明は、前述の説明によって限定されるものとはみなされず、添付の請求項の範囲によってのみ限定される。

符号の説明

- [0104]
- 1 分析用基板
 - 2 孔
 - 3 凸部
 - 4 凹部
 - 5 トラック領域
 - 10 反応領域
 - 11 検出対象物質

請求の範囲

- [請求項1] 固相担体に固定して検出対象物質を捕捉するために用いる捕捉用抗体であって、
- 前記検出対象物質に対する特異的結合活性を有する第1の抗体の官能基の少なくとも一部が前記官能基に結合可能な化合物によりブロックされている、
- 捕捉用抗体。
- [請求項2] 前記官能基がアミノ基である、請求項1に記載の捕捉用抗体。
- [請求項3] 請求項1又は2に記載の捕捉用抗体が固定された固相担体。
- [請求項4] 固相担体粒子に固定して検出対象物質を検出するために用いる検出用抗体であって、
- 前記検出対象物質に対する特異的結合活性を有する第2の抗体の官能基の少なくとも一部が前記官能基に結合可能な化合物によりブロックされている、
- 検出用抗体。
- [請求項5] 前記官能基がアミノ基である、請求項4に記載の検出用抗体。
- [請求項6] 請求項4又は5に記載の検出用抗体が固定された固相担体粒子。
- [請求項7] 請求項3に記載の固相担体と、
- 前記検出対象物質に対する特異的結合活性を有する検出用抗体と、
- を含む、検出対象物質の測定キット。
- [請求項8] 前記検出用抗体が、請求項4又は5に記載の検出用抗体である、
- 請求項7に記載の検出対象物質の測定キット。
- [請求項9] 請求項6に記載の固相担体粒子を含む、請求項8に記載の検出対象物質の測定キット。
- [請求項10] 請求項3に記載の固相担体に固定された前記捕捉用抗体に、試料を接触させる工程（i）と、
- 前記捕捉用抗体に捕捉された前記検出対象物質を測定する工程（ii）と、

を含む、検出対象物質の測定方法。

[請求項11]

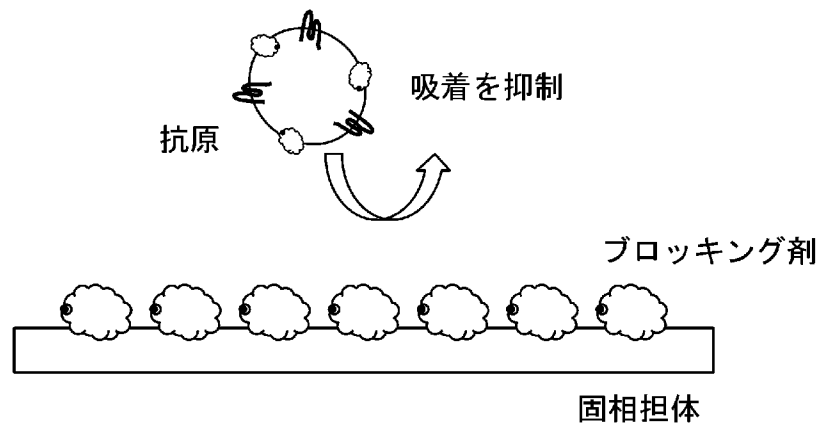
前記工程（ i i ）が、

前記試料を接触させた捕捉用抗体に、請求項 6 に記載の固相担体粒子を接触させる工程と、

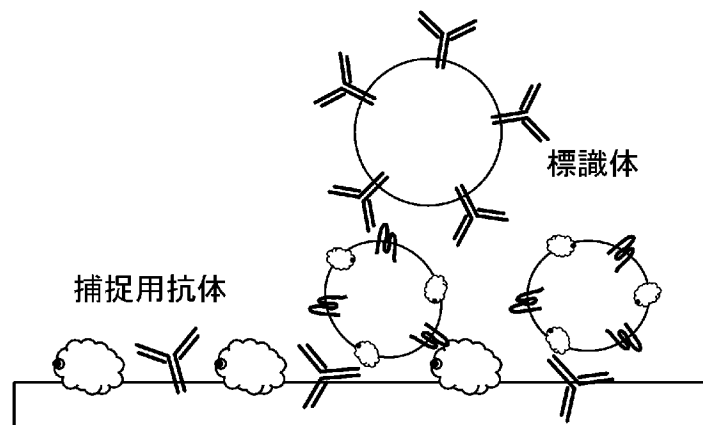
前記固相担体に捕捉された前記固相担体粒子を測定することにより、前記固相担体に捕捉された前記検出対象物質を測定する工程と、

を含む、請求項 1 0 に記載の検出対象物質の測定方法。

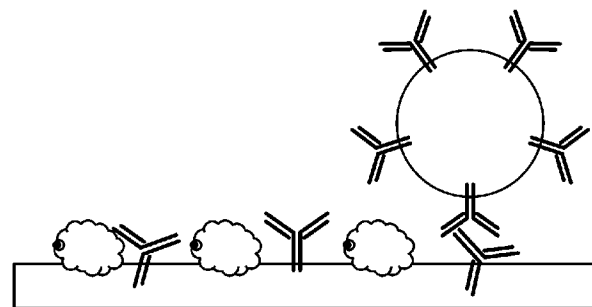
[図1A]



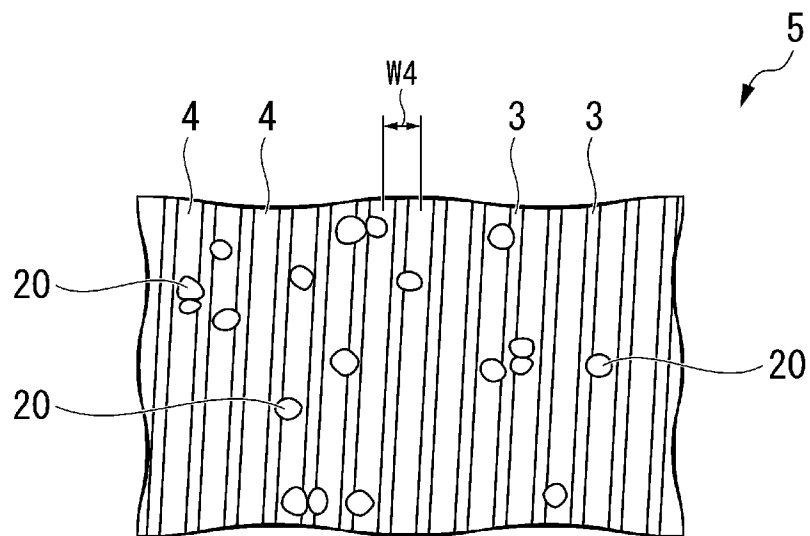
[図1B]



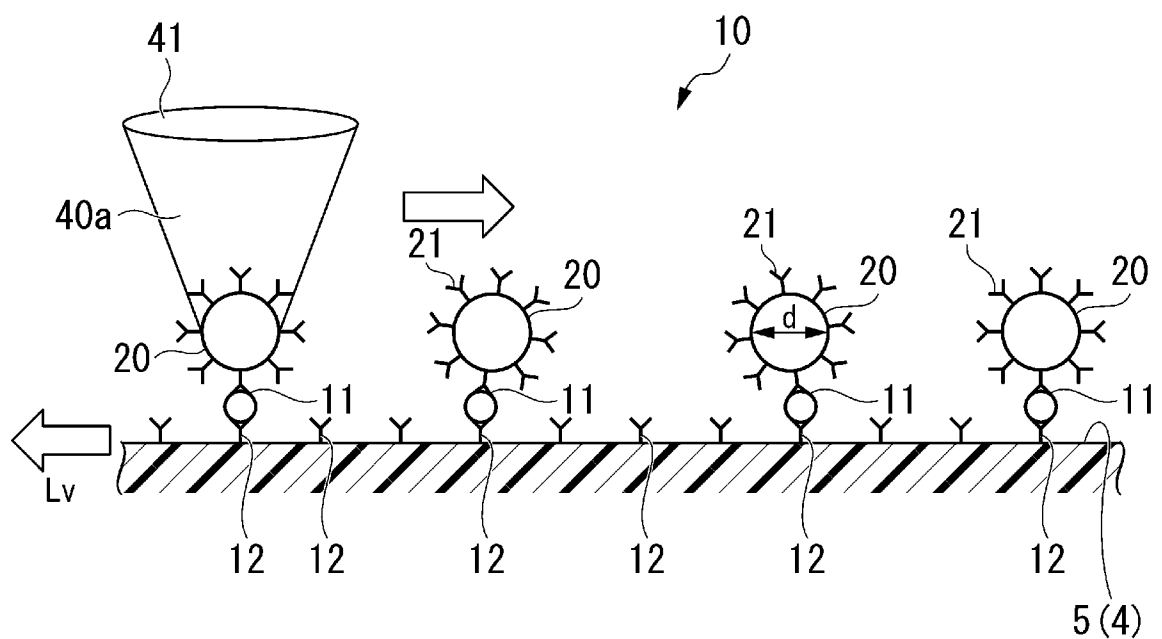
[図1C]



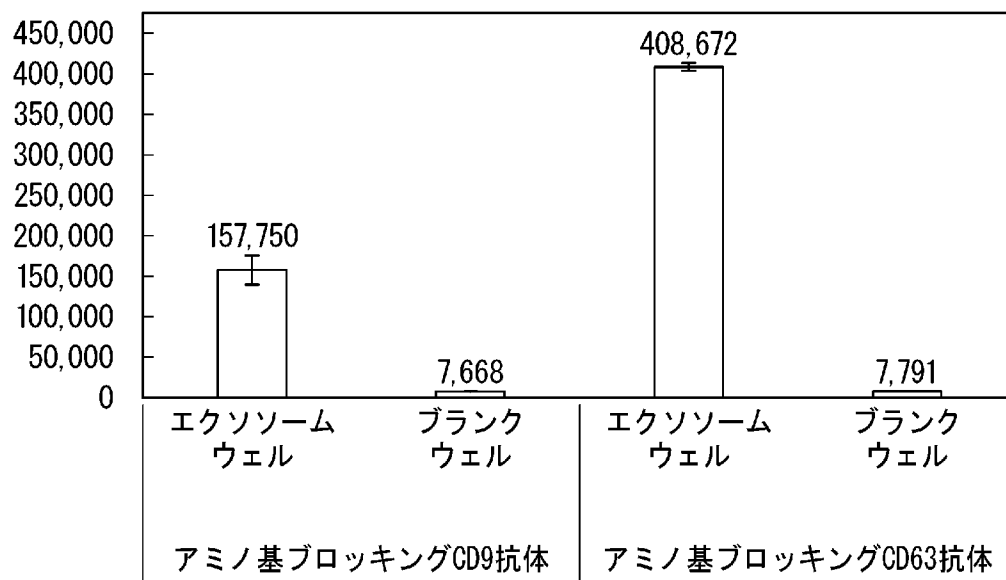
[図4]



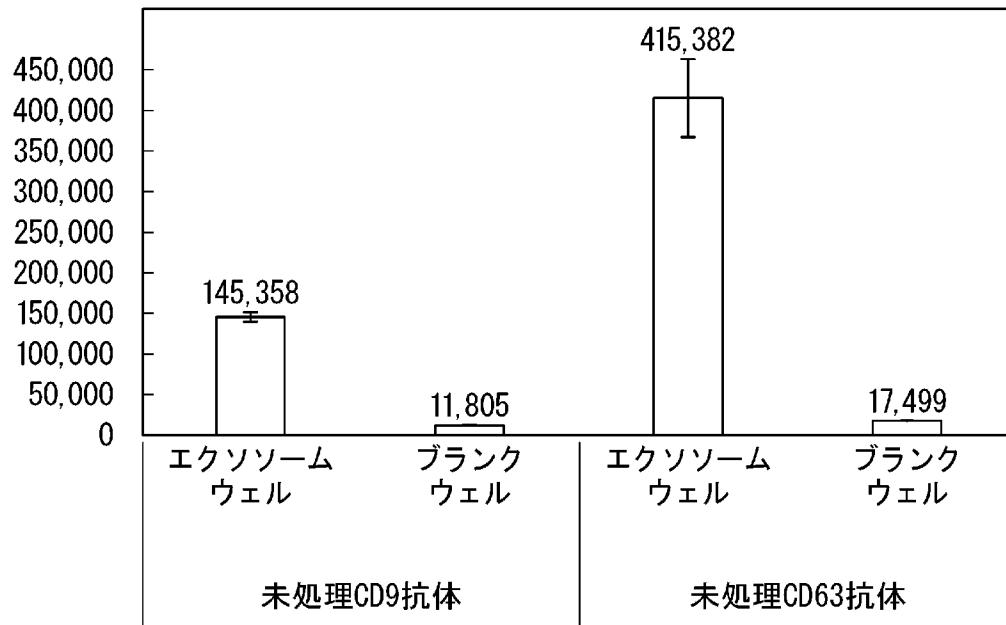
[図5]



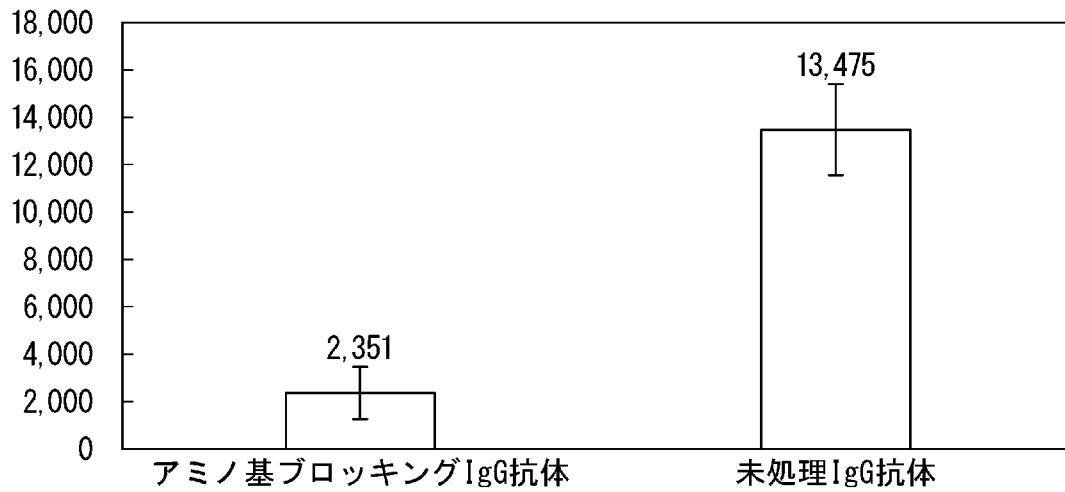
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/033154

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**C07K 16/00**(2006.01)i; **C07K 17/00**(2006.01)i; **G01N 33/543**(2006.01)i

FI: G01N33/543 501J; C07K16/00; C07K17/00

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)

C07K16/00; C07K17/00; G01N33/543

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Scopus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 7-27764 A (AKZO NOBEL NV) 31 January 1995 (1995-01-31) paragraphs [0011], [0032], [0039], [0042], [0054], [0072], [0076], [0078]-[0079]	1, 3, 7, 10
Y		4-6, 8-9, 11
X	JP 2016-173237 A (SUMITOMO BAKELITE CO) 29 September 2016 (2016-09-29) paragraphs [0005], [0031], [0039], [0056], [0058]-[0059], [0061], [0100], [0105], [0159], [0166], fig. 1	1-3, 7, 10
Y	WO 2017/150516 A1 (FUJIFILM CORP) 08 September 2017 (2017-09-08) paragraphs [0012], [0024], [0032], [0050]	4-6, 8-9, 11
A	JP 2017-223710 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 21 December 2017 (2017-12-21) entire text, all drawings	1-11
A	US 2010/0184103 A1 (JING, Naiyong) 22 July 2010 (2010-07-22) entire text, all drawings	1-11
A	JP 7-509128 A (BIONEBRASKA, INC) 12 October 1995 (1995-10-12) entire text, all drawings	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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

26 October 2021

Date of mailing of the international search report

09 November 2021

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/033154

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	7-27764	A	31 January 1995	EP 566205 A1 page 2, paragraph [0013], page 4, paragraph [0008], page 4, paragraph [0014] to page 5, paragraph [0001], page 5, paragraph [0005], page 6, paragraph [0008], page 10, paragraphs [0001], [0005], [0007]-[0009]	
JP	2016-173237	A	29 September 2016	(Family: none)	
WO	2017/150516	A1	08 September 2017	US 2018/0372638 A1 paragraphs [0029], [0045]- [0046], [0055]-[0056], [0079]- [0081] EP 3425397 A1 CN 108700581 A	
JP	2017-223710	A	21 December 2017	US 2014/0342382 A1 entire text, all drawings WO 2013/113663 A1 CN 104105966 A KR 10-2014-0128314 A	
US	2010/0184103	A1	22 July 2010	WO 2008/131063 A1 CN 101663582 A	
JP	7-509128	A	12 October 1995	US 5635371 A entire text, all drawings US 5656456 A WO 1994/001451 A2 EP 1170300 A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07K 16/00(2006.01)i; C07K 17/00(2006.01)i; G01N 33/543(2006.01)i FI: G01N33/543 501J; C07K16/00; C07K17/00														
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）） C07K16/00; C07K17/00; G01N33/543														
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 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2021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 - 2021年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2021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 - 2021年													
日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年													
日本国登録実用新案公報	1994 - 2021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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); Scopus														
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												
X	JP 7-27764 A (アクゾ ノーベル ナムローゼ フェンノートシャップ) 31.01.1995 (1995 - 01 - 31) 段落[0011], [0032], [0039], [0042], [0054], [0072], [0076], [0078]-[0079]	1, 3, 7, 10												
Y		4-6, 8-9, 11												
X	JP 2016-173237 A (住友ベークライト株式会社) 29.09.2016 (2016 - 09 - 29) 段落[0005], [0031], [0039], [0056], [0058]-[0059], [0061], [0100], [0105], [0159], [0166], 図1	1-3, 7, 10												
Y	WO 2017/150516 A1 (富士フイルム株式会社) 08.09.2017 (2017 - 09 - 08) 段落[0012], [0024], [0032], [0050]	4-6, 8-9, 11												
A	JP 2017-223710 A (エフ・ホフマンローラ ロシュ アーゲー) 21.12.2017 (2017 - 12 - 21) 全文全文	1-11												
A	US 2010/0184103 A1 (JING NAIYONG) 22.07.2010 (2010 - 07 - 22) 全文全文	1-11												
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。														
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>"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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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）</td> <td>"&" 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	"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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	"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	"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	"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	"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	"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）	"&" 同一パテントファミリー文献	"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の日の後に公表された文献	
* 引用文献のカテゴリー	"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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの													
"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	"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													
"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	"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													
"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）	"&" 同一パテントファミリー文献													
"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の日の後に公表された文献														
国際調査を完了した日 26.10.2021	国際調査報告の発送日 09.11.2021													
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 小澤 理 2J 1762 電話番号 03-3581-1101 内線 3250													

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
A	JP 7-509128 A (バイオネプラスカ・インコーポレーテッド) 12.10.1995 (1995 - 10 - 12) 全文全図	1-11

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/033154

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	7-27764	A	31.01.1995	EP 566205 A1 第2頁第13段落, 第4頁第8段落, 第4頁第14段落-第5頁第1段落, 第5頁第5段落, 第6頁第8段落, 第10頁第1, 5, 7-9段落	
JP	2016-173237	A	29.09.2016	(ファミリーなし)	
WO	2017/150516	A1	08.09.2017	US 2018/0372638 A1 段落[0029], [0045]-[0046], [0055]-[0056], [0079]-[0081]	
				EP 3425397 A1	
				CN 108700581 A	
JP	2017-223710	A	21.12.2017	US 2014/0342382 A1 全文全図	
				WO 2013/113663 A1	
				CN 104105966 A	
				KR 10-2014-0128314 A	
US	2010/0184103	A1	22.07.2010	WO 2008/131063 A1	
				CN 101663582 A	
JP	7-509128	A	12.10.1995	US 5635371 A 全文全図	
				US 5656456 A	
				WO 1994/001451 A2	
				EP 1170300 A1	