

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 8 月 24 日 (24.08.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/088192 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/545 (2006.01) G01N 33/566 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/302993
- (22) 国際出願日: 2006 年 2 月 21 日 (21.02.2006)
- (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 2005-043903 2005 年 2 月 21 日 (21.02.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP). 協和メデックス株式会社 (Kyowa Medex CO., Ltd.) [JP/JP]; 〒1046004 東京都中央区晴海一丁目 8 番 10 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 芹澤 武 (SERIZAWA, Takeshi) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人 東京大学内 Tokyo (JP). 松野 寿生 (MATSUNO, Hisao) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人 東京大学内 Tokyo (JP). 篠田 達也 (SHINODA, Tatsuya) [JP/JP]; 〒4110932 静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 600 番 1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 206 区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (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, 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, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, 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.
- (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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CARRIER FOR ANALYTICAL USE AND DETERMINATION METHOD USING THE SAME

(54) 発明の名称: 分析用担体及びそれを用いる測定方法

(57) Abstract: Disclosed are a carrier or capture molecule-bound carrier for use in the determination of an analyte in a sample; a determination method using the carrier or capture molecule-bound carrier; a reagent for the determination of an analyte, comprising the carrier or capture molecule-bound carrier; and a process for producing the carrier or capture molecule-bound carrier. A carrier comprising a support having on its surface an aggregate region composed of two or more polymers having different stereoregularities and a molecule-binding substance fixed on the aggregate region of the support; a capture molecule-bound carrier comprising the carrier and a capture molecule bound to the carrier through the molecule-binding substance; a reagent comprising the carrier or capture molecule-bound carrier; and a method for the determination of an analyte using the carrier or capture molecule-bound carrier.

(57) 要約: 本発明は試料中の測定対象物を測定するための担体及び捕捉分子結合担体、該担体及び捕捉分子結合担体を用いる測定方法、該担体または該捕捉分子結合担体を含む測定対象物測定用試薬、該担体または該捕捉分子結合担体の製造方法を提供する。表面に異なる立体規則性を有する 2 以上のポリマーの会合体領域を有する支持体及び該支持体の会合体領域に固定された分子結合用物質を含む担体、該担体に捕捉分子が該分子結合用物質を介して結合している捕捉分子結合担体、および該担体又は捕捉分子結合担体を含む試薬並びにそれを用いる測定対象物の測定方法に関する。

明 細 書

分析用担体及びそれを用いる測定方法

技術分野

- [0001] 本発明は、測定対象物を測定するための担体及び捕捉分子結合担体、該担体又は捕捉分子結合担体を含有する測定試薬、該担体及び捕捉分子結合担体の製造方法、該担体及び捕捉分子結合担体を用いる測定対象物の測定方法に関する。

背景技術

- [0002] 近年、病気の診断や創薬のため、生体内に発現した種々の物質の分析方法が開発され、使用されている。それに加え、遺伝子情報と細胞の生理的機能の関連を理解する上でも生体内物質の解析が必要であり、微量な物質の簡便で正確な測定方法が求められている。
- [0003] 物質の測定方法としては、抗原－抗体反応など特異的反応を利用した測定方法、酵素反応を利用した測定方法が知られている。具体的には、抗原などの測定対象物に特異的に結合する抗体などの物質を支持体に固定し、測定対象物と該測定対象物に特異的に結合する物質とを結合させ、結合した測定対象物を、種々の方法、例えばさらに抗体酵素複合体を結合させ結合した酵素量を測定する方法(ELISA法)、誘電率の変化を測定する方法(表面プラズモン共鳴法)、重量の変化を測定する方法(水晶振動子法)、発生する熱量を測定する方法(微量示差熱測定法)で測定することにより測定される(例えば、特許文献1及び2を参照)。また、別の態様としては、測定対象物を特異的に結合する酵素などの物質を支持体に固定し、測定対象物を結合させ、測定対象物と酵素との反応によって生じた反応生成物又はその変換によって生じる物質質量の変化、例えば光学的変化を検出することにより行うことができる。
- [0004] これらの測定方法では、抗体や酵素などの測定対象物に特異的に結合する物質を支持体に結合する必要がある。従来、例えば抗体の結合方法としては、支持体にプロテインA又はGを直接固定し該固定プロテインA又はGに抗体を結合する方法、支持体とプロテインA又はGとを架橋剤によって固定し該プロテインA又はGに抗体を

結合する方法などが報告されている(例えば、特許文献2及び3を参照)。酵素の結合方法として例えば、支持体に酵素を直接固定する方法、支持体と酵素を架橋剤によって固定する方法が一般に知られている。

[0005] しかし、測定の精度及び感度を向上する方法、測定の利便性を改善する方法、プロテインA、G又は酵素を固定した支持体の保存安定性を改善する方法、プロテインA、G又は酵素を固定した支持体のより簡便な調製方法などが求められている。尚、本発明に関連する先行技術文献は、以下のものがある。特許文献1:特開2004-37209号公報、特許文献2:特開2004-117026号公報、及び特許文献3:特開2002-340766号公報。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は上記の事情に鑑みなされたものであり、試料中の測定対象物を測定するための担体及び捕捉分子結合担体、該担体及び捕捉分子結合担体を用いる測定方法、該担体または該捕捉分子結合担体を含む測定対象物測定用試薬、該担体または該捕捉分子結合担体の製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らはこれらの課題を解決すべく鋭意検討を進めた結果、支持体表面に、異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体を形成し、該会合体表面に分子結合用物質及び必要によりさらに捕捉分子を固定することによって、上記の課題を解決できることを見出し、本発明を完成させた。該ポリマー会合体には分子結合用物質を高密度で架橋剤なしに簡便に固定することができ、長期間保存しても分子結合用物質の変性が抑制され、その結果、保存中の性能の低下を抑制することができ、正確で再現性の良好な測定を行うことができる。

[0008] 本発明は以下の1～23に関する。

1. 異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体領域を表面に有する支持体と、該支持体の会合体領域に固定された、分子結合用物質とを含む、試料中の測定対象物を測定するための担体。
2. 該会合体が立体相補的な会合を形成する会合体を含む上記1記載の担体。

3. 立体規則性を有する2以上のポリマーが、シンジオタクティックポリマーとアイソタクティックポリマーとを含む上記1又は2記載の担体。
4. 該会合体がらせん構造又はファンデルワールス構造を含む会合体である上記1～3の何れかに記載の担体。
5. 該ポリマーの少なくとも一つがポリメタクリレートである上記1～4の何れかに記載の担体。
6. ポリメタクリレートがポリメチルメタクリレート、ポリエチルメタクリレート、ポリイソプロピルメタクリレート又はポリn-プロピルメタクリレートである上記5記載の担体。
7. 支持体がプレート、チップ、ビーズ、繊維又はメンブレンの形態にある上記1～6の何れかに記載の担体。
8. 該担体がブロッキング剤によりブロッキング処理されたものである上記1～7のいずれかに記載の担体。
9. 分子結合用物質が、酵素である上記1～8の何れかに記載の担体。
10. 分子結合用物質が、捕捉分子結合用タンパク質である上記1～8の何れかに記載の担体。
11. 捕捉分子結合用タンパク質が、プロテインA、プロテインG、又はプロテインLである上記10記載の担体。
12. 上記10又は11記載の担体に、捕捉分子が該捕捉分子結合用タンパク質を介して結合している、試料中の測定対象物を測定するための捕捉分子結合担体。
13. 上記1～12の何れかに記載の担体を含む測定対象物測定用試薬。
14. 上記1～12の何れかに記載の担体を含む測定対象物測定用キット。
15. 異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体領域を表面に有する支持体を含む試薬、及び分子結合用物質を含む試薬を含有する、試料中の測定対象物の測定用キット。
16. さらに捕捉分子を含む試薬を含有する上記15に記載の測定用キット。
17. 上記10又は11に記載の担体と、捕捉分子とを接触させ、捕捉分子結合担体を形成させる工程、該捕捉分子結合担体と測定対象物とを接触させ捕捉分子を介して該測定対象物を担体に結合させる工程、及び該担体に結合した測定対象物を測定

する工程を含む、試料中の測定対象物の測定方法。

18. 捕捉分子と測定対象物とを接触させ、測定対象物結合捕捉分子を形成させる工程、上記10又は11に記載の担体と測定対象物結合捕捉分子とを接触させ該測定対象物を担体に結合させる工程、及び該担体に結合した測定対象物を測定する工程を含む、試料中の測定対象物の測定方法。

19. 上記9に記載の担体と、測定対象物とを接触させ、該測定対象物と担体に固定された酵素とを反応させる工程、及び該反応により増加又は減少する物質の変化量を測定する工程を含む、試料中の測定対象物の測定方法。

20. 上記12に記載の担体と測定対象物とを接触させ、捕捉分子を介して該測定対象物を担体に結合させる工程、及び該担体に結合した測定対象物を測定する工程を含む、試料中の測定対象物の測定方法。

21. 異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体領域を表面に有する支持体の会合体領域に分子結合用物質を固定することを特徴とする、試料中の測定対象物を測定するための担体の製造方法。

22. 異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体領域を表面に有する支持体の会合体領域に分子結合用物質を固定する工程、及び捕捉分子を該分子結合用物質に結合する工程を含む、試料中の測定対象物を測定するための捕捉分子結合担体の製造方法。

23. 支持体表面上の、異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体領域に、分子結合用物質を固定して試料中の測定対象物を測定するための担体用に用いられる、異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体領域を表面に有するポリマー付着支持体。

発明の効果

[0009] 本発明により、保存安定性の改善された担体、捕捉分子結合担体および測定試薬、測定の精度または感度が向上した測定試料中の測定対象物測定方法、並びに簡便な担体および捕捉分子結合担体の製造方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、分子結合用物質として捕捉分子結合用タンパク質を用いた場合の、担

体の形成反応、捕捉分子結合担体の形成反応および測定対象物結合反応の1態様を示す概略図である。

[図2]図2は、分子結合用物質として酵素を用いた場合の担体の形成反応、および、該担体上の酵素と測定対象物(基質)との反応の1態様を示す概念図である。

[図3]図3は、HSA抗原結合量とHSA抗原濃度との関係を表す検量線を示す。図中、○は実施例1の、□は比較例6の、△は比較例9のHSA抗原結合量をそれぞれ表す。

[図4]図4は、QCMチップによる β -ガラクトシダーゼの固定量の測定結果を表すグラフである。図中、○は実施例4の、●は比較例12の β -ガラクトシダーゼ結合量をそれぞれ表す。

[図5]図5は、マキシソーププレート上に固定した β -ガラクトシダーゼの活性評価を表すグラフである。図中、太線○は実施例5、細線□は比較例13、破線△は比較例14についての結果をそれぞれ表す。

[図6]図6は、マキシソーププレート上に7日間固定した β -ガラクトシダーゼの活性評価を表すグラフである。図中、太線○は実施例5、細線□は比較例13、波線△は比較例14についての結果をそれぞれ表す。

発明を実施するための最良の形態

[0011] 本発明で使用される支持体は、固相として使用できれば特に制限はなく、抗原抗体反応、酵素反応等特異的結合を利用して測定する方法等で測定、診断、検査等に使用される材料で構成された支持体を使用でき、固相化された測定対象物の測定方法に応じて適宜選択される。例えば、分光学的手法によって測定を行う場合には、用いる光の透過性に応じて支持体材料が選択される。

[0012] 支持体材料としては、水晶、ポリマー、ガラス、セラミックス等が挙げられるが、これらに限定されない。水晶としては、水晶振動子として用いられる各種の結晶形態が挙げられる。用途に応じ、適切な各種公知のカットを施してもよい。支持体材料のポリマーとしては、例えばポリメチルメタクリレート、ポリエチルメタクリレート、ポリ n -プロピルメタクリレート、ポリイソプロピルメタクリレート、ポリ n -ブチルメタクリレート、ポリイソブチルメタクリレート、ポリメタクリル酸などのポリメタクリレート、例えばポリメチルアクリ

レート、ポリエチルアクリレート、ポリn-ブチルアクリレート、ポリイソブチルアクリレート、ポリアクリル酸などのポリアクリレート、例えばビスフェノールAポリカーボネートなどのポリカーボネート、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ABSなどが挙げられる。ガラスとしては、ソーダライムガラス、ソーダ石灰ガラス、石英ガラスが挙げられる。

- [0013] 支持体には、測定対象物の測定の目的に応じて、金属薄膜(例えば金薄膜)、電極、プレコーティング等を適宜設けてもよい。
- [0014] 支持体は、例えば96や384ウェルプレートなど免疫測定用に供せられる測定プレート、例えばルミネックス社ビーズなどのビーズ、例えば免疫比濁法などに用いられる微粒子、磁性粒子、金コロイドなどの微粒子、例えばイムノクロマトグラフィやウェスタンブロッティングなどに供せられるメンブレン、例えば水晶発振子チップ、表面プラズモン共鳴法に用いられるチップ、1つの平板上に複数の抗体結合領域を有するチップ、微細加工技術によって支持体上に流路、反応場及び検出部を集積し構築されたバイオチップなどのチップ、例えばプロテイン・システム・サイエンス社のバイオストランド、中空繊維またはそれを複数本束ねた配列体(特開2001-133453)、グルコースセンサーに用いられる中空糸繊維からなる成形体(特表平6-7324)、ゲル充填中空繊維(特開2003-079377)、セルロース系成形体(特表平10-511144)などの繊維、などの形態を取りうる。
- [0015] 本発明における、異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体とは、2分子以上のポリマーの会合体であって、該2分子以上のポリマー中の全部又は一部が各々異なる立体規則性を有している会合体をさす。なお、該ポリマーは、ブロックコポリマー中のブロックであってもよい。また、異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体とは、一つの分子内に異なる立体規則性を有する2以上のブロック同士が会合して形成されたものであってもよい。つまり、該会合体には、立体規則性を有するブロックと該ブロックとは立体規則性の異なる他のブロックとを2以上有するポリマーにおいて、これらの2以上のブロック同士が会合して生ずる分子内会合体も含まれる。
- [0016] ポリマー会合体に用いられるポリマーの原料であるモノマーは、公知のものから選

択できる。例えば、モノマーは、プロピレン、1-ブテン、1-ペンテン、3-メチル-1-ブテン、4-メチル-1-ペンテン、4, 4-ジメチル-1-ペンテンなどのアルケン類、スチレン、2-メチルスチレン、3-メチルスチレン、2, 4-ジメチルスチレン、2, 5-ジメチルスチレン、3, 4-ジメチルスチレン、3, 5-ジメチルスチレンなどのスチレン類、ブタジエン、イソプレンなどのブタジエン類、メタクリル酸、メタクリル酸メチル、アクリル酸ブチル、N-イソプロピルアクリルアミド、N, N-ジイソプロピルアクリルアミド、アクリロニトリルなどのアクリル酸誘導体またはメタクリル酸誘導体、ブチルビニルエーテルなどのビニルエーテル類、塩化ビニルなどのハロゲン化ビニル類、プロピレンオキシド、スチレンオキシドなどのオキシラン類、アセトアルデヒドなどのアルデヒド類などから適宜選ぶことができるが、これらに制限されない。これらのモノマーは単独で用いてもよく、組み合わせて用いてもよい。

[0017] ポリマーの立体規則性は、上記モノマーを原料として、触媒、温度、溶媒などの実験条件を適宜選択することによって制御できる。重合方法としては任意の公知の手法を用いることができる。例えば、アニオン重合、配位アニオン重合、ラジカル重合などが挙げられる。また、上記モノマーを原料として重合したポリマーを適切な公知の手段によって分離することによって立体規則性を有するポリマーを分離することも可能である。

[0018] 本明細書において立体規則性とは、置換基のポリマー主鎖に対する配置に関する規則性と、鏡像異性体の1のみをモノマーとして使用することによって得られる規則性を含む。前者の規則性において、置換基がポリマー主鎖に対してどちらか一方の側にあるポリマーをアイソタクティックポリマー（以下、it-ポリマーと略記する）と呼び、置換基がポリマー主鎖をはさんで規則的に入れ替わっているポリマーをシンジオタクティックポリマー（以下、st-ポリマーと略記する）と呼ぶ。両者の性質が不規則に混在しているポリマーをアタクティックポリマーと呼ぶ。

[0019] it-ポリマーを与えるモノマーの例としては、例えばプロピレン、1-ブテン、1-ペンテン、3-メチル-1-ブテン、4-メチル-1-ペンテン、4, 4-ジメチル-1-ペンテン、スチレン、2-メチルスチレン、3-メチルスチレン、2, 4-ジメチルスチレン、2, 5-ジメチルスチレン、3, 4-ジメチルスチレン、3, 5-ジメチルスチレン、ブタジエ

ン、メタクリル酸、メチルメタクリレートなどのメタクリル酸誘導体、ブチルアクリレート、ブチルビニルエーテル、N, N-ジイソプロピルアクリルアミド、プロピレンオキシド、アセトアルデヒドなどが挙げられるが、これらには限定されない。

[0020] st-ポリマーを与えるモノマーの例としては、例えばブタジエン、メチルメタクリレートなどのメタクリル酸誘導体、N-イソプロピルアクリルアミドなどが挙げられるが、これらには限定されない。

[0021] 本発明における立体規則性を有するポリマーは、理想的な立体規則性を有するものに限られず、分子内に多少乱れた構造であってもよく、ある規則性がある程度の長さ続いたようなポリマーであってもよい。

[0022] 立体規則性に関しては、it-ポリマーのアイソタクティシティー(%mm;3連子表示)が一般には70以上、好ましくは80以上、さらに好ましくは90以上であり、st-ポリマーのシンジオタクティシティー(%rr;3連子表示)が一般には70以上、好ましくは80以上、さらに好ましくは90以上である。

[0023] ポリマーの数平均分子量(Mn)としては一般には1,000以上、好ましくは5,000以上、さらに好ましくは10,000以上である。ポリマーの重量平均分子量(Mw)としては一般には1,000以上、好ましくは5,000以上、さらに好ましくは10,000以上である。数平均分子量に対する重量平均分子量の比(Mw/Mn)は、1以上であり、一般には5以下、好ましくは2以下、さらに好ましくは1.5以下である。

[0024] 前述の通り、本発明における立体規則性を有するポリマーには、鏡像異性体の1種類を重合単位として重合されたポリマーも含まれる。該ポリマーと該ポリマーと立体規則性の異なるポリマーの組み合わせとしては、例えばポリD-乳酸およびポリL-乳酸の組み合わせをあげることができる。

[0025] 本発明では、会合体の中でも該ポリマー同士が立体相補的に会合した会合体が好ましい。本明細書では、ポリマー同士が立体相補的に会合した会合体をステレオコンプレックスと呼ぶ。立体相補的な会合とは、ステレオコンプレックスを形成するポリマーの自由エネルギーが極小値又は局小値をとり安定化するように会合すること、及び、該ポリマーが最密充填となる態様で会合することを含む。ステレオコンプレックスを形成するポリマーとしては、ポリメタクリレート、ポリ乳酸などが挙げられる。

- [0026] 本発明で用いられるポリメタクリレートは、メタクリル酸およびポリメタクリル酸エステルよりなる群から選択されるモノマーを重合して得られるポリマーであれば制限はなく、重合単位が1種類のホモポリマーであっても重合単位が複数の種類のコポリマーであってもよい。本発明のポリメタクリレートの具体例としては、ポリメチルメタクリレート(以下、PMMAと略記する)、ポリエチルメタクリレート(以下、PEMAと略記する)、ポリn-プロピルメタクリレート、ポリイソプロピルメタクリレートなどが挙げられるが、これらに限定されない。ポリメタクリレートは、Polymer Source, Inc.、Polyscience, Inc.、Aldrich社、ナカライ社などから入手可能である。
- [0027] ステレオコンプレックスの例としては、立体規則性を有するポリマーと、該ポリマーと立体規則性の異なりかつ該ポリマーの長さに対して様々な長さ比を有するポリマーの間で形成される構造が例示され、好ましくは上記ポリマー同士がお互いの間に働くファンデルワールス力によってらせんを形成した構造(以下、らせん構造と呼ぶ)及びファンデルワールス凝集に基づいて形成されるらせんを形成した構造以外の構造(以下、ファンデルワールス構造と呼ぶ)などが挙げられる。らせんを形成した構造としては、具体的には二重らせんを形成した構造(以下、二重らせん構造と呼ぶ; 芹澤ら、J. Am. Chem. Soc. 2000, Vol. 122, p.1891を参照)、が挙げられるがこれらに限定されない。
- [0028] 二重らせん構造は、it-ポリマーが2倍の長さのst-ポリマーに囲まれ、両者間にファンデルワールス力が働いて会合した構造である。二重らせん構造中のit-ポリマーとst-ポリマーは同一であっても異なってもよい。例えば、it-ポリマーおよびst-ポリマーの両方にPMMAを用いてもよく、it-ポリマーおよびst-ポリマーの一方にPMMAを、他方にPEMAを用いてもよい。ファンデルワールス構造としては、同じ長さのit-ポリマーとst-ポリマーとが会合した構造が知られている。
- [0029] ステレオコンプレックスの形成方法に特に制限はない。例えば、適切な溶媒に会合すべきポリマーを溶解混合することによっても作成でき、必要に応じて所望のステレオコンプレックスを分離することによって作成してもよい。好ましくは、J. Am. Chem. Soc., 2000 Vol. 122, p.1891に記載の交互積層(レイヤー・バイ・レイヤー (Layer-by-Layer))法(以下、LbL法と略記する)が用いられる。この方法は、支持体をシンジオタク

ディックポリメタクリレート溶液に浸漬する工程と支持体をアイソタクティックポリメタクリレート溶液に浸漬する工程とを含むステレオコンプレックス層の作成サイクルを1回以上行い、ステレオコンプレックスを含むポリマー膜を形成する工程を含む。より具体的には、it-ポリマーおよびst-ポリマーを適切な溶媒(以下、成膜溶媒とする)に別々に溶解し、支持体をit-ポリマー溶液に浸漬してit-ポリマーを吸着させた後、必要に応じて洗浄・乾燥し、引き続いてst-ポリマー溶液に浸漬することにより、it-ポリマーとst-ポリマーとからなる二重らせん構造やファンデルワールス接触構造のステレオコンプレックスが一層形成される。その後、支持体を洗浄、乾燥することにより、過剰なst-ポリマーは除去され、ステレオコンプレックス層が残る。このサイクルを繰り返すことにより、サイクル数に応じたステレオコンプレックス層が積層され、ポリマー膜が形成される。サイクル内で、it-ポリマーとst-ポリマーの浸漬順序は逆転させてもよい。捕捉分子結合用タンパクの固定を行うことができる限り、サイクル数、つまりステレオコンプレックス層の数に制限はなく、1回のみでも2回以上でもよい。支持体全体を確実に覆うためには、サイクル数は2回以上、好ましくは5回以上である。サイクル数の上限に特に制限はないが、経済的な観点からは50回以下、好ましくは30回以下である。

[0030] 成膜溶媒は、水、極性有機溶媒、またはそれらの混合物から選択できる。極性有機溶媒としては例えばアセトニトリル、ジメチルホルムアミド、アセトン、アルコール類、ジメチルスルフォキシド、ジオキサンなどが挙げられる。水は緩衝剤を含んでいてもよい。ポリマー濃度は、膜を形成させるのに好適な濃度であれば制限はなく、一般には0.1mg/mL以上、好ましくは0.5mg/mL以上、さらに好ましくは1mg/mL以上であり、一般には20mg/mL以下、好ましくは10mg/mL以下、さらに好ましくは1～5mg/mL以下である。

[0031] 成膜温度は、一般には4℃以上、好ましくは10℃以上、さらに好ましくは20℃以上であり、一般には50℃以下、好ましくは40℃以下、さらに好ましくは30℃以下である。浸漬時間は、一般には1分間以上、好ましくは3分間以上、さらに好ましくは5分間以上である。上限は特に設けなくてもよいが、好ましくは60分間以下、さらに好ましくは30分間以下である。

[0032] 表面に異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体領域を有する支持体

としては、前述の通り、前述の支持体の表面の一部または全部が前述の異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体支持体で覆われたものを意味するが、例えば、異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体そのもので構成されるものでもよい。この場合、支持体と該支持体上に形成されるポリマー会合体とを同時に一体として調製することができ、別々に調製しなくてもよい点で好ましい。

[0033] 分子内会合体の場合、成膜以外の形態に容易に成形できるため、ビーズ等での使用にも適する。分子内会合体を形成するポリマーの1態様としては、アイソタクティックブロックとシンジオタクティックブロックとを有するブロックコポリマー、鏡像異性体の1種類を重合単位として重合されたブロックと他の種類の鏡像異性体を重合単位として重合されたブロックとを有するブロックコポリマーがあげられる。

[0034] 該ブロックコポリマーは、アイソタクティックブロックとシンジオタクティックブロックとを直接又はリンカーを介して結合させることにより製造してもよく、ブロック重合により製造してもよい。具体的な態様としては、以下の方法が挙げられる。低温リビングアニオン重合により立体規則性ポリメタクリレートを合成する際、反応停止剤の適切な選択により、片末端に水酸基、カルボキシル基、アミノ基などを有するポリマーが合成できる。これらの末端基間のエステルあるいはアミド形成による縮合あるいは適切なリンカーへの結合により、一つの分子内にアイソタクティックブロックならびにシンジオタクティックブロックが共存するブロックコポリマーが合成できる。これらは、相互作用によりヘアピン状となり、安定な分子内ステレオコンプレックスを形成する。

[0035] また、該ブロックコポリマーは、鏡像異性体の1種類を重合単位として重合されたブロックにさらに続けて他の種類の鏡像異性体を重合することにより製造してもよく、また、鏡像異性体の1種類を重合単位として重合されたブロックと他の種類の鏡像異性体を重合単位として重合されたブロックとを直接又はリンカーを介して結合させることにより製造してもよい。具体的には適切な条件下で鏡像異性体の一方のポリ乳酸ブロックを開環重合によって合成した後に、他方の乳酸の鏡像異性体を添加してさらに重合反応を行わせることによってポリD-乳酸ブロックとポリL-乳酸ブロックとを含むブロックコポリマーを合成できる。また、具体的にはポリD-乳酸ブロックとポリL-乳酸ブロックの合成の際に、上記と同様に適切な反応停止剤を選択することによって、

上記と同様の縮合反応または結合反応の結果、ブロックコポリマーを得ることができる。該ブロックコポリマーは、分子内相互作用によって安定な分子内ステレオコンプレックスを形成する。

[0036] 本発明における分子結合用物質とは、前述の、異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体領域を表面に有する支持体の会合体領域に固定することができる物質を意味する。支持体の会合体領域に固定された分子結合用物質は、測定対象物質に親和性を有し、直接測定対象物に結合等することができ、あるいは、場合によっては以下に説明する捕捉分子と結合することができる。このような場合は、測定対象物を、捕捉分子を介して分子結合用物質と結合等させることができる。このような分子結合用物質として、プロテインA、プロテインGまたはプロテインL、Fcレセプター、又はそれらの組み合わせなど捕捉分子結合用タンパク質が挙げられ、直接測定対象物と結合することができる分子結合用物質として、酵素等が挙げられる。

[0037] 本発明の分子結合用物質として酵素を用いる場合、例えば酸化還元酵素、転移酵素、加水分解酵素、脱離酵素、異性化酵素、合成酵素等を好適に使用することができる。

[0038] 酸化還元酵素としては、 CH-OH を供与体とするもの、アルデヒドまたはオキシ基を供与体とするもの、 CH-CH を供与体とするもの、 CH-NH_2 を供与体とするもの、 CH-NH を供与体とするもの、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(以下、NADHと略記する。)または還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸(以下、NADPHと略記する。)に作用するもの、窒素化合物を供与体とするもの、ジフェノールまたは関連化合物を供与体とするもの、過酸化水素を受容体とするもの、分子状酸素を取り込み一対の供与体に作用するもの、スーパーオキシドを受容体として作用するもの、硫黄を含む基を供与体とするもの、ヘムを供与体とするもの、水素分子を供与体とするもの、分子状酸素を取り込み単一の供与体に作用するもの(オキシゲナーゼ)、 CH 基または CH_2 基に作用するもの、鉄硫黄タンパクを供与体とするもの、還元型フラボドキシンを供与体とするもの等があげられる。

[0039] CH-OH を供与体とするものとしては、例えばアルコールデヒドロゲナーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グリセロールデヒドロゲナーゼ、グリセロール-3

ーリン酸デヒドロゲナーゼ、 3α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、 7α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、 12α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、L-乳酸デヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ、ピラノースオキシダーゼ、グリセロールオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、L- α -グリセロリン酸オキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、D-乳酸デヒドロゲナーゼ、マレイン酸デヒドロゲナーゼ、イソプロピルマレイン酸デヒドロゲナーゼ、ホスホグルコネートデヒドロゲナーゼ、フラクトースデヒドロゲナーゼ、D-3-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ、マンニトールデヒドロゲナーゼ、グルクロネートレダクターゼ等があげられる。

[0040] アルデヒドまたはオキシ基を供与体とするものとしては、例えばピルビン酸オキシダーゼ、グリセロアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ等があげられる。

[0041] $\text{CH}-\text{CH}$ を供与体とするものとしては、例えばアシル-CoAデヒドロゲナーゼ、ビリルビンオキシダーゼ等があげられる。

[0042] $\text{CH}-\text{NH}_2$ を供与体とするものとしては、例えばグルタメートシンセターゼ、アラニンデヒドロゲナーゼ、チラミンオキシダーゼ、アミノオキシダーゼ、ブトレシンオキシダーゼ、グルタメートデヒドロゲナーゼ、ロイシンデヒドロゲナーゼ、L-アミノ酸オキシダーゼ、チトクロームP450等があげられる。

[0043] $\text{CH}-\text{NH}$ を供与体とするものとしては、例えばサルコシンオキシダーゼ、サルコシンデヒドロゲナーゼ、 $\Delta 1$ -ピペリدين-2-カルボン酸レダクターゼ等があげられる。

[0044] NADHまたはNADPHに作用するものとしては、例えばグルタチオンレダクターゼ、ジアホラーゼ、NADH-フラビンモノヌクレオチド(以下、FMNと略記する。)オキシドレダクターゼ、NADPH-FMNオキシドレダクターゼ、ジヒドロリポアミドレダクターゼ等があげられる。

[0045] 窒素化合物を供与体とするものとしては、例えばウリカーゼ等があげられる。

[0046] ジフェノールまたは関連化合物を供与体とするものとしては、例えばアスコルビン酸

オキシダーゼ等があげられる。

- [0047] 過酸化水素を受容体とするものとしては、例えばペルオキシダーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ等があげられる。
- [0048] 分子状酸素を取り込み一対の供与体に作用するものとしては、例えばp-ヒドロキシ安息香酸4-モノオキシゲナーゼ、サリチル酸1-モノオキシゲナーゼ、ステロイド11 β -モノオキシゲナーゼ、フェニルアラニン4-モノオキシゲナーゼ、ドーパミン β -モノオキシゲナーゼ等があげられる。
- [0049] スーパーオキシドを受容体として作用するものとしては、例えばスーパーオキシドディスムターゼ等があげられる。
- [0050] 硫黄を含む基を供与体とするものとしては、例えば亜硫酸レダクターゼ、ヒポタウリンデヒドロゲナーゼ、亜硫酸オキシダーゼ、チオールオキシダーゼ、グルタチオン-ホモシステイントランスヒドロゲナーゼ、プロテイン-ジスルファイドレダクターゼ、グルタチオン-システイントランスヒドロゲナーゼ、グルタチオンデヒドロゲナーゼ等があげられる。
- [0051] ヘムを供与体とするものとしては、例えばチトクロームcオキシダーゼ、硝酸レダクターゼ等があげられる。
- [0052] 水素分子を供与体とするものとしては、例えばハイドロゲンデヒドロゲナーゼ、チトクロームc3ヒドロゲナーゼ等があげられる。
- [0053] 分子状酸素を取り込み単一の供与体に作用するもの(オキシゲナーゼ)としては、例えばカテコール1,2-ジオキシゲナーゼ、カテコール2,3-ジオキシゲナーゼ、トリプトファン2,3-ジオキシゲナーゼ、リポキシゲナーゼ、アスコルベート2,3-ジオキシゲナーゼ、アルギニン2-モノオキシゲナーゼ、リジン2-モノオキシゲナーゼ、トリプトファン2-モノオキシゲナーゼ、乳酸2-モノオキシゲナーゼ、レニラルシフェリン2-モノオキシゲナーゼ、ウミホタルルシフェリン2-モノオキシゲナーゼ、ホタルルシフェリン2-モノオキシゲナーゼ等があげられる。
- [0054] CH基またはCH₂基に作用するものとしては、例えばキサンチンデヒドロゲナーゼ、ニコチン酸デヒドロゲナーゼ等があげられる。
- [0055] 鉄硫黄タンパクを供与体とするものとしては、例えばフェロドキシナーゼ酸化型NAD

レダクターゼ、フェロドキシナー酸化型NADPレダクターゼ等があげられる。

[0056] 還元型フラボドキシンを供与体とするものとしては、例えばニトロゲナーゼ等があげられる。

[0057] 転移酵素としては、炭素1個の基を転移するもの、アルデヒドまたはケトンを転移するもの、アシル転移酵素、グリコシル転移酵素、メチル基以外のアルキル基またはアリル基を転移するもの、窒素を含む基を転移するもの、リンを含む基を転移するもの、硫黄を含む基を転移するもの等があげられる。

[0058] 炭素1個の基を転移するものとしては、例えばニコチンアミドメチルトランスフェラーゼ、ヒスタミンメチルトランスフェラーゼ、ホモシステインメチルトランスフェラーゼ等があげられる。

[0059] アルデヒドまたはケトンを転移するものとしては、例えばトランスケトララーゼ、トランスアルドラーゼ等があげられる。

[0060] アシル転移酵素としては、例えばアミノ酸アセチルトランスフェラーゼ、グルコサミンアセチルトランスフェラーゼ、コリンアセチルトランスフェラーゼ、リン酸アセチルトランスフェラーゼ、アセチルCoAアシルトランスフェラーゼ、ガラクトシドアセチルトランスフェラーゼ、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ、リゾレシチンアシルトランスフェラーゼ、スフィンゴシンアシルトランスフェラーゼ、グリシンアセチルトランスフェラーゼ、グルタミン酸アセチルトランスフェラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、ペプチジルトランスフェラーゼ、クエン酸シンターゼ、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ、ホスホトランスアセチラーゼ、トランスグルタミナーゼ等があげられる。

[0061] グリコシル転移酵素としては、例えばホスホリラーゼ、プリンヌクレオチドホスホリラーゼ、シュクロースホスホリラーゼ、マルトースホスホリラーゼ、グリコーゲンシンターゼ、セルロースシンターゼ、キチンシンターゼ、UDPグルクロノシルトランスフェラーゼ、UDPガラクトース-コラーゲンガラクトシルトランスフェラーゼ、GDPフコース-糖タンパクフコシルトランスフェラーゼ等があげられる。

[0062] メチル基以外のアルキル基またはアリル基を転移するものとしては、例えばジメチルアリルトランスフェラーゼ、テルペノイド-アリルトランスフェラーゼ、アミノプロピルトランスフェラーゼ、ファルネシルトランスフェラーゼ、ホスホセリンスルフィドリラーゼ等が

あげられる。

- [0063] 窒素を含む基を転移するものとしては、例えばアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、ジアミノ酸アミノトランスフェラーゼ、アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ等があげられる。
- [0064] リンを含む基を転移するものとしては、例えばクレアチンキナーゼ、ミオキナーゼ、ヘキソキナーゼ、ホスホグルコムターゼ、ホスホグリセロムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、グリセロールキナーゼ、酢酸キナーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、ホスホグリセレートキナーゼ、ポリヌクレオチドホスホリラーゼ、ホスホリパーゼA2、アデノシンキナーゼ、チミジンキナーゼ、プロテインキナーゼ、アデニル酸キナーゼ、ヌクレオシドーリン酸キナーゼ、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ、ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ、FMNアデニリルトランスフェラーゼ、DNAヌクレオチジルトランスフェラーゼ、RNAヌクレオチジルトランスフェラーゼ、エタノールアミンホスホトランスフェラーゼ、ホスファチジルセリンシンターゼ等があげられる。
- [0065] 硫黄を含む基を転移するものとしては、例えばアリルスルホトランスフェラーゼ、エストロンスルホトランスフェラーゼ、コンドロイチンスルホトランスフェラーゼ、アセチルCoAトランスフェラーゼ等があげられる。
- [0066] 加水分解酵素としては、エステル結合に作用するもの、グリコシル化合物に作用するもの、エーテル結合に作用するもの、ペプチド結合に作用するもの、ペプチド以外のC-N結合に作用するもの、酸無水物に作用するもの、C-C結合に作用するもの、ハロゲン化物に作用するもの、P-N結合に作用するもの、S-N結合に作用するもの等があげられる。
- [0067] エステル結合に作用するものとしては、例えばカルボキシエステラーゼ、アリルエステラーゼ、リゾホスホリパーゼ、コレステロールエステラーゼ、ホスホリパーゼA2、ホスホリパーゼC、ホスホリパーゼD、スフィンゴミエリナーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、リポプロテインリパーゼ、5'ヌクレオチダーゼ、3'ヌクレオチダーゼ、グルコース6-リン酸ホスファターゼ、フルクトースビスホスファターゼ、ホスホジエステラーゼ、アリルサルファターゼ、ステロールサルファターゼ、エキソデオキシリボヌクレアーゼ、エキソリボヌクレアーゼ、エンドデオキシリボヌクレアーゼ、エンドリボヌクレ

アーゼ等があげられる。

- [0068] グリコシル化合物に作用するものとしては、例えば α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、セルラーゼ、デキストラナーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、リゾチーム、 α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、 β -フコシダーゼ、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、エンド1, 3- β -グルカナーゼ、エンド1, 3- β -ガラクタナーゼ、エンド1, 4- β -ガラクタナーゼ、グルカン1, 6- α -グルコシダーゼ、ノイミニダーゼ、インベルターゼ、ヌクレオシダーゼ、イソプルラナーゼ等があげられる。
- [0069] エーテル結合に作用するものとしては、例えばアデノシルメチオニンヒドロラーゼ等があげられる。
- [0070] ペプチド結合に作用するものとしては、例えばアミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、プロリルアミノペプチダーゼ、プリンイミノペプチダーゼ、ピログルタミルペプチダーゼ、ジペプチジルペプチダーゼ、ジペプチジルカルボキシペプチダーゼ、トリプシン、キモトリプシン、トロンビン、プラスミン、血液凝固因子、カリクレイン、エラスターゼ、カテプシン、パパイン、フィチン、ブロメライン、キモパパイン、システインプロテイナーゼ、ペプシン、キモシン、アスパラギン酸プロテイナーゼ、コラゲナーゼ等があげられる。
- [0071] ペプチド以外のC-N結合に作用するものとしては、例えばウレアーゼ、クレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチニンデアミナーゼ、クレアチナーゼ、クレアチニナーゼ、アスパラギナーゼ、グルタミナーゼ、アミノアシラーゼ、N-アセチルムラモイルアラニンアミダーゼ等があげられる。
- [0072] 酸無水物に作用するものとしては、例えばアピラーゼ、ATPピロホスファターゼ等があげられる。
- [0073] C-C結合に作用するものとしては、例えばオキサロアセターゼ等があげられる。
- [0074] ハロゲン化物に作用するものとしては、例えばアルキルハリダーゼ、ハロアセテートデハロゲナーゼ、フルオロアセテートデハロゲナーゼ等があげられる。
- [0075] P-N結合に作用するものとしては、例えばホスホアミダーゼ等があげられる。
- [0076] S-N結合に作用するものとしては、例えばスルホグルコサミンスルホヒドロラーゼ等

があげられる。

- [0077] 脱離酵素としては、炭素－炭素結合に作用するもの、炭素－酸素結合に作用するもの、炭素－窒素結合に作用するもの、炭素－硫黄結合に作用するもの、リン－酸素結合に作用するもの等があげられる。
- [0078] 炭素－炭素結合に作用するものとしては、例えばN－アセチルノイラミン酸アルドラーゼ、オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ、リブロースビスホスフェートカルボキシラーゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、フルクトースビスホスフェートアルドラーゼ、フェニルセリンアルドラーゼ等があげられる。
- [0079] 炭素－酸素結合に作用するものとしては、例えばエノラーゼ、アコニターゼ、カーボニックアンヒドラーゼ、トリプトファンシンセターゼ、スレオニンシンターゼ、ニトリルヒドラーゼ等があげられる。
- [0080] 炭素－窒素結合に作用するものとしては、例えばアスパラギン酸アンモニアリアーゼ、アルギノコハク酸リアーゼ、ウロポルフィリノーゲンIシンターゼ等があげられる。
- [0081] 炭素－硫黄結合に作用するものとしては、例えばシスタチオニンγリアーゼ、シスタチオニンβリアーゼ、メチオニンγリアーゼ等があげられる。
- [0082] リン－酸素結合に作用するものとしては、例えばアデニレートシクラーゼ、グアニレートシクラーゼ等があげられる。
- [0083] 異性化酵素としては、ラセマーゼとエピメラーゼ、シス－トランスイソメラーゼ、分子内酸化還元酵素、分子内転移酵素、分子内脱離酵素等があげられる。
- [0084] ラセマーゼとイソメラーゼとしては、例えばムタロターゼ、アラニンラセマーゼ、セリンラセマーゼ、アミノ酸ラセマーゼ、乳酸ラセマーゼ等があげられる。
- [0085] シス－トランスイソメラーゼとしては例えばマレイン酸イソメラーゼ、リノール酸イソメラーゼ等があげられる。
- [0086] 分子内酸化還元酵素としては、例えばホスホグルコースイソメラーゼ、キシロースイソメラーゼ、マンノースイソメラーゼ、グルクロン酸イソメラーゼ等があげられる。
- [0087] 分子内転移酵素としては、例えばリゾレシチンアシルムターゼ、ホスホグリセレートホスホムターゼ、リジン2, 3－アミノムターゼ、メチルアスパラギン酸ムターゼ等があげら

れる。

[0088] 分子内脱離酵素としては、例えばフラボノリアーゼ等があげられる。

[0089] 合成酵素としては、炭素－酸素結合を生成するもの、炭素－硫黄結合を生成するもの、炭素－窒素結合を生成するもの、炭素－炭素結合を生成するもの、リン酸エステルを生成するもの等があげられる。

[0090] 炭素－酸素結合を生成するものとしては、例えばチロシル－tRNAシンセターゼ、ロイシル－tRNAシンセターゼ、メチオニル－tRNAシンセターゼ、リジル－tRNAシンセターゼ、グルタミル－tRNAシンセターゼ等があげられる。

[0091] 炭素－硫黄結合を生成するものとしては、例えばアシル－CoAシンセターゼ、アセチル－CoAシンセターゼ、サクシニル－CoAシンセターゼ等があげられる。

[0092] 炭素－窒素結合を生成するものとしては、例えばグルタミンシンセターゼ、アスパラギンシンセターゼ、酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドシンセターゼ、グルタチオンシンセターゼ、パントテン酸シンセターゼ、グアノシンモノホスフェートシンセターゼ、ウレアカルボキシラーゼ、グルタメート－システインリガーゼ等があげられる。

[0093] 炭素－炭素結合を生成するものとしては、例えばアセチルCoAカルボキシラーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、プロピオニルCoAカルボキシラーゼ等があげられる。

[0094] リン酸エステルを生成するものとしては、例えばポリデオキシリボヌクレオチドシンセターゼ、ポリリボヌクレオチドシンセターゼ等があげられる。

[0095] 本発明における捕捉分子とは、分子結合用物質と測定対象物との双方に対して結合親和性を有し、測定対象物と試料中に含まれる夾雑物質とを分離しうる分子を意味する。本発明において分子結合用物質がプロテインA、プロテインGまたはプロテインL、Fcレセプター等の捕捉分子結合用タンパク質である場合は、これら捕捉分子結合用タンパク質と結合しうる捕捉分子を用いるのが好ましい。本発明における捕捉分子の例としては、抗体及びそのフラグメントが含まれる。その他の例として、抗体又は抗体フラグメントにリガンドが結合した分子、抗体又は抗体フラグメントを含有する複合体、タンパク質、核酸、脂質、糖、糖鎖、アプタマー (Nature, 1992, Vol. 355, p. 850)、分子インプリティングによって作製されたポリマーの鋳型 (Nature, 1993, Vol. 361, p. 645) などの測定対象物を捕捉する部位と分子結合用物質へ結合する部位とを含む。

む分子が挙げられる。なお、分子結合用物質への結合部位は、分子結合用物質に応じて選択される。例えば、分子結合用物質がプロテインA又はプロテインGの場合、該部位としてFcを選択することができ、プロテインLの場合、Fabを選択することができる。

- [0096] 捕捉分子が抗体である場合、測定対象物は、該抗体に特異的な抗原、ハプテン、又はそれらの複合体となる。ここで抗原の複合体とは、抗原以外に他の成分、例えば抗体や酵素を含有するものを指す。ハプテンの複合体とは、ハプテン以外に他の成分、例えば抗体や酵素を含有するものを指す。抗原抗体複合体の態様では、該抗原抗体複合体において占有されていない別のエピトープに特異的な抗体を、分子結合用物質に結合させる。
- [0097] 分子結合用物質及び測定対象物と結合する限り、捕捉分子としての抗体は全分子であってもフラグメントであってもよい。フラグメントとしては、Fab、F(ab)₂、Fab'、F(ab')₂、1個のFabと完全なFcを有するFab/c、測定対象物質を結合する分子を結合したFc及びそれらの組み合わせが挙げられる。プロテインA、プロテインGと結合するためには、Fcを有することが好ましい。一方、プロテインLと結合するためには、Fabを有することが好ましい。測定対象物質を結合する分子を結合したFcは、公知の共有結合を利用した方法や、公知の遺伝子工学的手法によって作製することが可能である。
- [0098] 本発明で用いられる捕捉分子としての抗体に制限はなく、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、キメラ抗体、ヒト型化抗体、ヒト抗体等が挙げられる。抗体の免疫グロブリンクラスに制限はなく、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4などのIgG、IgM、IgA、及びIgEが挙げられる。抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよく、均質な抗体を安定に生産できる点ではモノクローナル抗体が好ましい。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は当業者に周知の方法により作製することができる。尚、分子結合用物質が酵素である場合は、捕捉分子は不要である。
- [0099] 本発明は、表面に異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体領域を有する支持体の会合体領域に分子結合用物質及び場合により捕捉分子を固定することを特徴とする、試料中の測定対象物を測定するための担体の製造方法に関する。

また本発明は、表面に異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体領域を有する支持体の会合体領域に分子結合用物質を固定する工程、及び場合により捕捉分子を該分子結合用物質に結合する工程を含む、試料中の測定対象物を測定するための担体の製造方法に関する。

[0100] 異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体上に分子結合用物質を固定する方法に特に制限はなく、各種公知の方法を用いることができる。例えば、分子結合用物質を溶解して得られる溶解液を該会合体に接触させる方法が好ましい。接触方法としては、該会合体上に溶解液をコーティングまたはスポッティングする方法などが挙げられ、コーティング方法としては例えば、ディップコート、スピコート、グラビアコート、スプレイコートなどが挙げられる。分子結合用物質を溶解する溶液としては、後述の水性媒体が好適である。該溶解液に含まれる分子結合用物質の濃度は如何なる濃度でも構わないが、上記会合体上に飽和状態で分子結合用物質が結合されることを達成する濃度であることが望ましい。該溶解液に含まれる分子結合用物質の濃度は、一般には0.01 μ mol/L以上、好ましくは0.1 μ mol/L以上、さらに好ましくは0.2 μ mol/L以上であり、該物質が溶解液に適切な粘性をもって溶解する限り上限は設けないが、一般には1mmol/L以下、好ましくは100 μ mol/L以下、さらに好ましくは50 μ mol/L以下である。接触する時の温度は、分子結合用物質が変性しない温度が好ましく、一般には0℃以上、好ましくは4℃以上、より好ましくは15℃以上であり、一般には70℃以下、好ましくは50℃以下、より好ましくは40℃以下である。接触時間は特に制限は無く、接触する時の温度によって適宜選択でき、一般には接触直後から、好ましくは10分間以上、より好ましくは30分間以上であり、一般には48時間以下、好ましくは24時間以下、より好ましくは2時間以下である。本発明の担体は、ポリマー会合体上に固定された分子結合用物質の変性が抑制され、これによって保存安定性が向上した担体であることから、分子結合用物質に接触させた状態のまま長時間放置する態様も可能である。

[0101] また、分子結合用物質として、特に酵素を用いる場合、異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体上に酵素を固定する方法に特に制限はなく、各種公知の方法を用いることができる。例えば、酵素を溶解して得られる溶解液を該会合体に接

触させる方法が好ましい。接触方法としては、例えば前述の接触方法が挙げられる。酵素を溶解する溶液としては、後述の水性媒体が好適である。該溶解液に含まれる酵素の濃度は如何なる濃度でも構わないが、上記会合体上に飽和状態で酵素が結合されることを達成する濃度であることが望ましい。該溶解液に含まれる酵素の濃度は、一般には $0.05 \mu\text{mol/L}$ 以上、好ましくは $0.5 \mu\text{mol/L}$ 以上、さらに好ましくは $1 \mu\text{mol/L}$ 以上であり、該タンパク質が溶解液に適切な粘性をもって溶解する限り上限は設けないが、一般には $100 \mu\text{mol/L}$ 以下、好ましくは $10 \mu\text{mol/L}$ 以下、さらに好ましくは $5 \mu\text{mol/L}$ 以下である。接触する時の温度は、酵素が変性しない温度が好ましく、一般には 0°C 以上、好ましくは 4°C 以上、より好ましくは 15°C 以上であり、一般には 70°C 以下、好ましくは 50°C 以下、より好ましくは 40°C 以下である。接触時間は特に制限はなく、接触する時の温度によって適宜選択でき、一般には接触直後から、好ましくは10分間以上、より好ましくは30分間以上であり、一般には48時間以下、好ましくは24時間以下、より好ましくは2時間以下である。本発明の担体は、ポリマー会合体上に固定された酵素の変性が抑制され、これによって保存安定性が向上した担体であることから、酵素に接触させた状態のまま長時間放置する態様も可能である。

[0102] 分子結合用物質として例えば前述の捕捉分子結合用タンパク質を用いる場合には、さらに該捕捉分子結合用タンパク質に捕捉分子を結合させることができるが、かかる方法に特に制限はなく、任意の公知の手法を用いることができる。例えば、捕捉分子を溶解した溶液と捕捉分子結合用タンパク質とを接触する方法が挙げられ、接触方法および条件としては例えば前述の分子結合用物質を固定する接触方法および条件を用いてもよい。

[0103] 本発明の担体は、分子結合用物質が前述の捕捉分子結合用タンパク質である場合は、捕捉分子と結合する試料中の測定対象物を測定するための担体であって、表面に異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体領域を有する支持体及び該支持体の会合体領域に固定された分子結合用物質を含む。また、該担体に、場合により分子結合用物質を介して前記捕捉分子を結合させることができ、本明細書ではこのような担体を特に捕捉分子結合担体と称することがある。捕捉分子結合担体も、本発明の好適な担体の一種である。

- [0104] また、分子結合用物質が酵素である場合は、本発明の担体(酵素固定化担体)は酵素反応によって試料中の測定対象物を測定するための担体、または、連続的な酵素反応を可能とするための担体であって、表面に異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体領域を有する支持体及び該支持体の会合体領域に固定化された酵素を含む。本発明の酵素固定化担体は、例えばセンサー、イムノクロマトグラフィー、バイオリアクターなどに用いることも可能である。
- [0105] 本発明の担体および捕捉分子結合担体は、ブロッキング剤によるブロッキング処理を施したものが好ましい。ブロッキング剤は、分子結合用物質が占有していない領域を占有することが好ましい。該ブロッキングにより、測定試料中に含まれる測定対象物以外の物質がポリマー会合体及び支持体に吸着すること、及び／又は、測定対象物が分子結合用物質又は捕捉分子以外の部分で担体に結合することを防ぎ、測定の精度や再現性を高めることができる。
- [0106] ブロッキング剤としては、ウシ血清アルブミン、カゼイン、ゼラチン、スキムミルク、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール等の吸水性基材に対し吸着性を有する物質、またはブロックエース(大日本製薬)等の市販のブロッキング剤等が挙げられる。ブロッキング剤は、後述の水性溶媒などの適切な溶媒にこれを溶解し得られる溶解液を、本発明の担体及び捕捉分子結合担体と接触することによって使用できる。該溶解液に含まれるブロッキング剤の含有量は、一般には0.1重量%以上、好ましくは1重量%以上であり、溶媒に溶解できる限り上限は設けないが、好ましくは10重量%以下である。ブロッキング剤を固定する方法は、一般に使用されている物理吸着又は化学結合が挙げられる。ブロッキング処理の温度、時間の条件は、前述の分子結合用物質を固定する接触条件を用いてもよい。
- [0107] 実用的な観点からは、捕捉分子を結合していない担体を予め準備して保存しておき、測定の直前に測定対象物に対応する捕捉分子を結合させて捕捉分子結合担体とし、測定に供するという態様が好ましい。また、ブロッキング剤でブロッキング処理した担体または捕捉分子結合担体をあらかじめ準備して保存し、測定対象物の測定に直ちに使用できる態様も好ましい。分子結合用物質が異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合を介して支持体に固定してなる本発明の担体は、安定性に優

れ、担体を乾燥させた状態でも保存可能であり、上記の態様での使用に適している。乾燥状態での保存温度は2℃から40℃が好ましく、4℃から30℃がより好ましい。

[0108] また、本発明は、支持体の異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体領域に分子結合用物質を固定して試料中の測定対象物を測定するための担体用に用いられる、表面に異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体領域を有するポリマー付着支持体を含む。

[0109] 該ポリマー付着支持体は、測定前に分子結合用物質を固定し、さらに捕捉分子を結合させ、測定に供される。

[0110] 本発明において、分子結合用物質が例えばプロテインA(捕捉分子結合用タンパク質の1つ)である場合には、ポリメタクリレートのステレオコンプレックスを含むポリマー会合体膜上に、プロテインAを直接固定することができる。その結果、担体を簡便に調製することができる。また、該ポリマー会合体膜を設けることによってプロテインA固定後の担体の性能が経時劣化することを抑制することができ、保存安定性が改善される。従来の固定方法と比較して、該ポリマー会合体膜とプロテインAとの直接の相互作用を用いることにより、プロテインAの変性が抑制されているとも考えられる。さらに、単位面積当たりの測定対象物結合量を増加させることができ、測定感度の向上をもたらす。何れの理論にも束縛されるものではないが、該ポリマー膜上ではプロテインAが3次元的な成長(SKモード)ではなく層状成長(FMモード)するため、抗体の結合に供される面積が増大し、抗体が効率よく結合するためとも考えられる。また、プロテインAの配向性を制御して、プロテインAが有する抗体との結合表面を、抗体が結合する効果が得られるように抗体に対して提示でき、それによって抗体が結合しやすくなるとも考えられる。

[0111] 本発明において、分子結合用物質が酵素である場合には、ポリメタクリレートのステレオコンプレックスを含むポリマー会合体膜上に、酵素を直接固定することができる。その結果、担体を簡便に調製することができる。別の態様では、該ポリマー会合体膜を設けることによって酵素固定後の担体の性能が経時劣化することを抑制することができ、保存安定性が改善される。従来の固定方法と比較して、該ポリマー会合体膜と酵素との直接の相互作用を用いることにより、酵素の変性が抑制されているとも考えら

れる。さらに別の態様では、単位面積当たりの酵素反応効率を増加させることができ、測定感度または生成物の生産効率の向上をもたらす。何れの理論にも束縛されるものではないが、該ポリマー膜上では酵素が3次元的な成長(SKモード)ではなく層状成長(FMモード)するため、基質と酵素の結合に供される面積が増大し、基質が酵素と効率よく接触するためとも考えられる。また、酵素の配向性を制御して、酵素が有する基質との結合表面を、基質が結合する効果が得られるように基質に対して提示でき、それによって基質が結合しやすくなるとも考えられる。

- [0112] 本発明は、本発明の担体を用いた試料中の測定対象物の測定方法にも関する。本発明の測定方法において使用される試料としては、本発明の測定方法を可能とする試料であれば特に制限はなく、例えばヒトまたはヒト以外の動物由来の生体液(血液、血清、血漿、尿、糞便、喀痰、唾液、腹腔内液など)、植物・微生物から分離抽出された液、食品・食品原材料から分離抽出された液、化学品の製造工程から発生する液、河川・海水、大気、土壌などの環境中から分離抽出された液、測定対象物を既知濃度あるいはある一定濃度になるよう緩衝液などに人工的に添加された液などが挙げられる。
- [0113] 本発明の測定方法は、反応液中、前述の担体と測定対象物を接触させ、該測定対象物と担体に固定された酵素とを反応させる工程、及び該反応により増加又は減少する物質を測定する工程を含む。
- [0114] さらに、本発明の測定方法は、反応液中、前述の担体と捕捉分子とを接触させ捕捉分子結合担体を形成させる工程、該捕捉分子結合担体と測定対象物とを接触させ捕捉分子を介して該測定対象物を担体に結合させる工程及び該担体に結合した測定対象物を測定する工程を含む。
- [0115] また本発明の測定方法は、反応液中、捕捉分子と測定対象物とを接触させ測定対象物結合捕捉分子を形成させる工程、前述の担体と測定対象物結合捕捉分子と接触させ該測定対象物を担体に結合させる工程及び該担体に結合した測定対象物を測定する工程を含む。
- [0116] さらに、本発明の方法は、反応液中、捕捉分子結合担体と測定対象物とを接触させ捕捉分子を介して該測定対象物を担体に結合させる工程及び該担体に結合した

測定対象物を測定する工程を含む。

- [0117] 本発明の測定方法に使用する反応液としては、担体と測定対象物が、あるいは担体と捕捉分子とが、あるいは捕捉分子結合担体と測定対象物とが反応できる溶媒で有れば特に制限はないが例えば水性媒体、有機溶媒、超臨界流体などがあげられるが、水性媒体が好ましい。水性媒体としては例えば脱イオン水、蒸留水、緩衝液等があげられるが、緩衝液が好ましい。緩衝液に用いる緩衝剤は緩衝能を有するものならば特に限定されないが、pH1～11の例えば乳酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤、酢酸緩衝剤、コハク酸緩衝剤、フタル酸緩衝剤、リン酸緩衝剤、トリエタノールアミン緩衝剤、ジエタノールアミン緩衝剤、リジン緩衝剤、バルビツール緩衝剤、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝剤、イミダゾール緩衝剤、リンゴ酸緩衝剤、シュウ酸緩衝剤、グリシン緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、炭酸緩衝剤、グッド緩衝剤等があげられる。グッド緩衝剤としては、例えば2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)、ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン(Bis-Tris)、N-(2-アセトアミド)イミノニ酢酸(ADA)、ピペラジーン-N, N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)、N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸(ACES)、3-モルホリノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(MOPSO)、N, N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸(BES)、3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS)、N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]-2-アミノエタンスルホン酸(TES)、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸(HEPES)、3-[N, N-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(DIPSO)、N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]-2-ヒドロキシ-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPSO)、ピペラジーン-N, N'-ビス(2-ヒドロキシプロパンスルホン酸)(POPISO)、3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(HEPPSO)、3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸[(H)EPPS]、N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシン(Tricine)、N, N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン(Bicine)、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPS)、N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸(CHES)、N-シクロヘキシル-3-アミノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(CAPS)

O)、N-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸(CAPS)等があげられる。緩衝液の濃度は測定に適した濃度であれば特に制限はされないが、0.001~2.0mol/Lが好ましく、0.005~1.0mol/Lがより好ましく、0.01~0.1mol/Lが特に好ましい。

- [0118] 有機溶媒としては、例えばエタノール、メタノール、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジオキサン、ヘキサン、ベンゼン、イソオクタンなどがあげられる。超臨界流体としては、例えば超臨界二酸化炭素、超臨界水、超臨界エタノール、超臨界メタノールなどがあげられる。
- [0119] 反応温度としては、特異的反応を行うことが出来る条件であれば特に制限はないが、一般には0℃以上、好ましくは4℃以上、より好ましくは15℃以上であり、一般には70℃以下、好ましくは50℃以下、より好ましくは40℃以下である。反応時間は特に制限は無く、反応温度によって適宜選択でき、一般には反応直後から、好ましくは1分間以上、より好ましくは5分間以上であり、一般には24時間以下、好ましくは4時間以下、より好ましくは2時間以下である。
- [0120] 本発明の測定方法は、定量的な用途にも定性的な用途にも用いることができる。定量的な用途には、測定する物性変化を定量的に測定し、結合した測定対象物の量に換算すればよい。また、例えば、担体上の複数の捕捉分子結合領域にそれぞれ異なる捕捉分子を固定し、各領域における物性の変化量を定量的に測定し、結合した測定対象物の量に換算することによって、複数の測定対象物を一度に定量することも可能である。
- [0121] 定性的な用途としては、担体上の複数の領域にそれぞれ異なる捕捉分子を固定し、どの領域に測定対象物が結合するかを検出することにより、測定対象物を同定するという用途が挙げられる。あるいは支持体上の複数の領域にそれぞれ異なる分子結合用物質を固定し、その領域に測定対象物質を結合するかを検出することにより、測定対象物を同定するという用途も挙げられる。本発明の測定方法により、過渡応答などの時間に依存した変化を測定し、速度論的な解析を行ってもよい。
- [0122] 以下、分子結合用物質が捕捉分子結合用タンパク質である場合、酵素である場合、それぞれの場合について、測定対象物の測定方法、測定用キットを詳細に説明す

る。

・分子結合用物質が捕捉分子結合用タンパク質である場合

分子結合用物質が前述の捕捉分子結合用タンパク質である場合、測定対象物の測定は、測定対象物と担体との結合により生じる物性の変化を検出することにより行うことができる。測定方法は、該物性に応じて適宜選択される。ここで物性には、分光学的な特性、発光及び蛍光、放射線の放出、物理的な形状、誘電率、光学特性、及び重量などが含まれる。測定する物性の変化に応じ、任意の公知の測定手段が選択される。

[0123] 本発明の1の態様では、標識物質が結合されている抗体、または標識物質と抗体を含む複合体(以下、これらを総称して抗体標識複合体と呼ぶ)によって測定対象物をラベル化する。標識は酵素、蛍光物質、放射性同位元素、コロイドなどから適宜選択できる。別の態様では、担体の凝集を測定する。この態様に適した支持体としてはラテックスまたは金コロイドなどの微粒子があげられる。

[0124] 標識が酵素の場合(一般にELISA法と呼ばれる)、酵素反応によって色素を生成させ、公知の分光学的装置により検出することができる。酵素反応によって発光を呈する場合には、公知の化学発光検出装置を用いることができる。標識が蛍光物質の場合には、公知の蛍光測定装置を用いることができる。標識が放射性同位元素の場合(一般にラジオイムノアッセイ法と呼ばれる)には、公知の放射線検出装置を用いることができる。標識がコロイドの場合には原子間力顕微鏡や走査型トンネル顕微鏡などの走査型プローブ顕微鏡や電子顕微鏡により直接的に観察してもよい。ただし、金コロイドのように着色物質でラベル化された測定対象物の場合には、分光学的に検出することもできる。ラテックスなどの微粒子の凝集(一般には免疫比濁法と呼ばれる)の場合には、吸光度変化や光分散などの分光学的手法が用いられる。

[0125] 水晶子振動法では振動周波数の変化を測定し、表面プラズモン共鳴法(SPR)では誘電率の変化に起因する反射角の変化を測定し、微量示差熱測定法では熱量を測定する。ラベル化していない測定対象物では、高分解能電子顕微鏡、走査型プローブ顕微鏡、走査型近接場顕微鏡などにより直接的に観察してもよい。また、測定のため、上記標識の態様に応じた任意の測定装置、具体的には分光学的装置、蛍光検

出装置、化学発光検出装置、放射線検出装置などを用いることができる。使用される分光法には、赤外吸収、紫外可視吸収、ラマン散乱などが挙げられる。

[0126] 本発明の担体を用いて、測定試料中の複数の測定対象物を同時に測定することも可能である。この場合、本発明の担体を組み合わせて用いることにより、すなわち、測定対象物に応じて異なる種類の捕捉分子を固定することにより、同時に複数種類の測定対象物を測定することができる。この同時多項目測定法により、検査や診断の迅速化が図られる。

[0127] 同時項目測定法のため、1つの担体に複数の捕捉分子結合領域を設け、各領域毎に異なる捕捉分子を結合させてもよい。1つの担体内に複数の種類の捕捉分子を結合させることにより、多数の試料を一度に測定することができ、スクリーニングの高速化を図ることができる。

[0128] 上記の態様の場合、96または384プレート、ビーズ、チップなどの担体に捕捉分子をあらかじめ固定することが好ましい。プレートおよびチップでは、捕捉分子結合領域がどの測定対象物の測定に使用されているかを知るための手段が必要とされる。ビーズでは、ビーズと測定対象物とを対応させる手段が必要とされる。好ましい態様としては、米国特許5981180号明細書に開示されている通り、レーザー光を照射し、ビーズが保有する蛍光色素から発せられる信号を詳細に分類することによってビーズを識別することが可能である。あるいは、WO 01/59454に開示されている通り、捕捉分子結合領域表面に付されたバーコードを最も適した方法で検出することによって、ビーズを識別することが可能である。

[0129] 各捕捉分子結合領域の物性変化を測定し、同時に又は一定時間後に抗体結合領域と測定対象物を対応させることによって、各対象物を一度に測定することが可能である。

[0130] 捕捉分子結合領域の識別が可能な具体的測定装置としては次のものが挙げられる。プレートの場合は、変化する物性に応じた検出器を具備したプレートリーダーであり、チップの場合には変化する物性に応じた検出器を備えた画像解析装置を含む測定装置(例:パーキンエルマー社スキャンアレイシリーズ)、ビーズの場合はビーズに付与された識別記号を読み取る検出器と、変化する物性に応じた検出器とを備えた

測定装置(例:ルミネックス社ルミネックス100)が挙げられる。

- [0131] 本発明は、前述の担体を含む測定用キットにも関する。測定用キット中の担体以外の構成要素は、測定手法に応じて任意の公知の要素を選択することができる。
- [0132] ELISA法では、酵素標識抗体、酵素標識抗体希釈液、酵素反応基質液、酵素反応停止液、洗浄液等が挙げられる。さらに、ブロッキング剤、標準物質、測定試料希釈液等を任意に加えることもできる。
- [0133] 蛍光免疫測定法では、蛍光標識抗体、蛍光標識抗体希釈液、洗浄液等が挙げられる。さらに、ブロッキング剤、標準物質、測定試料希釈液等を任意に加えることもできる。
- [0134] ラジオイムノアッセイ法では、放射性標識抗体、放射性標識抗体希釈液、洗浄液等が挙げられる。さらに、ブロッキング剤、標準物質、測定試料希釈液等を任意に加えることもできる。
- [0135] SPR、水晶振動子、微量示差熱、走査型電子顕微鏡、原子間力顕微鏡などの方法では、シグナルを増強するための抗体、洗浄液、標準物質、測定試料希釈液等を任意に加えることができる。
- [0136] イムノクロマト法では、抗体結合領域を含むメンブレンを担体とし、サンプルパッド、コンジュゲートパッド、吸収パッドなどをハウジング内に配置されたテストストリップが測定キットに含まれる。測定キット中のテストストリップ以外の構成要素として、酵素、蛍光、放射性物質、金コロイドなどから任意に選ばれた標識を有する標識抗体、標識抗体希釈液、洗浄液等が挙げられる。さらに、ブロッキング剤、標準物質、測定試料希釈液等を任意に加えることもできる。
- [0137] 免疫比濁法や金コロイド凝集法では、ラテックスや金コロイドなどの微粒子を担体とし、担体希釈液、洗浄液などが測定キットの構成要素として挙げられる。さらに、ブロッキング剤、標準物質、測定試料希釈液等を任意に加えることもできる。
- [0138] 本発明の測定対象物としては、ヒト血清アルブミン(HSA)、ウシ血清アルブミン(BSA)、IgG、IgM、IgA、IgE、アポ蛋白AI、アポ蛋白AII、アポ蛋白B、アポ蛋白E、リウマチファクター、D-ダイマー、酸化LDL、グリコアルブミン、トリヨードサイロニン(T3)、総サイロニン(T4)、薬剤(抗テンカン剤等)、C-反応性蛋白(CRP)、サイトカイ

ン類、 α -フェトプロテイン(AFP)、癌胎児性抗原(CEA)、CA19-9(carbohydrate antigen 19-9)、CA15-3(carbohydrate antigen 15-3)、CA-125(carbohydrate antigen 125)、PIVKA-II(Protein induced by vitamin K absence-II)、副甲状腺ホルモン(PTH)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、インスリン、C-ペプチド、エストロゲン、抗グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)抗体、ペプシノーゲン、HBV抗原、抗B型肝炎ウイルス(HBV)抗体、C型肝炎ウイルス(HCV)抗原、抗HCV抗体、成人T細胞性白血病ウイルス1型(HTLV-I)抗原、抗HTLV-I抗体、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)抗体、結核抗体、結核菌抗原(TBGL)、マイコプラズマ抗体、ヘモグロビンA1c、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、トロポニンT、トロポニンI、クレアチンキナーゼ-MB(CK-MB)、ミオグロビン、H-FABP(ヒト心臓由来脂肪酸結合蛋白)、デオキシニバレノール(DON)、ニバレノール(NIV)、T-2トキシン(T2)等のカビ毒類、ビスフェノールA、ノニルフェノール、フタル酸ジブチル、ポリ塩素化ビフェニル(PCB)類、ダイオキシン類、p, p'-ジクロロジフェニルトリクロロエタン、トリブチルスズ等の内分泌攪乱物質類、大腸菌等の菌類、卵、乳、小麦、そば、落花生等の食物アレルギー物質やコナヒョウダニやトヤヒョウダニ等のダニ類等のアレルギー物質、抗アレルギー物質抗体等があげられる。

[0139] 分子結合用物質として、捕捉分子結合用タンパク質を用いた場合の本発明の担体および捕捉分子結合担体の形成、ならびに、該担体と測定対象物との反応の1態様を図1に示す。

・分子結合用物質が酵素である場合

分子結合用物質が酵素である場合、測定対象物の測定は、測定対象物と酵素との反応により増加する反応生成物又は減少する反応基質の変化量を測定することにより行うことができる。該測定は、該反応生成物又は反応基質を直接測定することもできるが、適当な物質に変換して測定することもできる。測定方法及び変換方法は適宜選択される。ここで測定には、分光学的な測定、発光及び蛍光測定、誘電率測定などが含まれ、測定する物質に応じ、任意の公知の測定手段が選択される。

[0140] 測定は、例えば反応生成物が色素または特定の波長の光を吸収する物質である

場合には、公知の分光学的装置により、反応生成物が発光を呈する場合には、公知の化学発光検出装置を用いて、反応生成物が蛍光物質の場合には、公知の蛍光測定装置を用いて行うことができる。

[0141] 測定を高スループットで行う目的には電極を具備したセンサーの態様がより好適である。電極として例えば過酸化水素電極、溶存酸素電極、電導度電極、イオン電極、pH電極、酸化還元電極などがあげられる。電極は、反応生成物の種類によって適宜使い分けることができる。例えば反応生成物が過酸化水素であれば過酸化水素電極、電子または電荷をもつ物質やイオンである場合には電導度電極、イオン電極やpH電極、反応が酸素消費を伴うものであれば溶存酸素電極、反応が酸化還元電位の変化を生じるものであれば酸化還元電極などを用いることができる。電極を具備したセンサーは小型で簡易な装置を構成できるため、持ち運びの容易な装置とするためには好適である。

[0142] 本発明の担体(酵素固定化担体)には、2種以上の酵素が固定されてもよい。測定対象物を2種以上の酵素を用いて検出可能な物質(色素、光、蛍光など)に変換する場合には、当該2種以上の酵素の全て又は一部を支持体の会合体領域に固定することができる。

[0143] 本発明の担体(酵素固定化担体)を用いて、測定試料中の複数の測定対象物を同時に測定することも可能である。この場合、本発明の担体を組み合わせて用いることにより、すなわち、測定対象物に応じて異なる種類の酵素を固定することにより、1つの試料を用いて複数種類の測定対象物を同時に測定することができる。この同時多項目測定法により、検査や診断の迅速化が図られる。同時項目測定法のため、1つの担体に複数の酵素結合領域を設け、各領域毎に異なる酵素を結合させてもよい。1つの担体内に複数の種類の酵素を結合させることにより、多数の試料を一度に測定することができ、スクリーニングの高速化を図ることができる。

[0144] 上記の態様の場合、96または384プレート、チップなどの担体に酵素をあらかじめ固定することが好ましい。プレートおよびチップでは、酵素結合領域がどの測定対象物の測定に使用されているかを知るための手段が必要とされる。

[0145] 各酵素結合領域の物質質量変化を測定し、同時に又は一定時間後に酵素領域と測

定対象物を対応させることによって、各対象物を一度に測定することが可能である。

[0146] 酵素結合領域の識別が可能な具体的測定装置としては次のものが挙げられる。プレートの場合は、変化する物質質量に応じた検出器を具備したプレートリーダーであり、チップの場合には変化する物質質量に応じた検出器を備えた画像解析装置を含む測定装置(例:パーキンエルマー社スキャンアレイシリーズ)が挙げられる。

[0147] また、本発明の担体(酵素固定化担体)は複数の試料を連続的に測定する場合にも適している。例えば、本態様は、複数の試料を別の容器に投入し、容器内の試料に順次、担体を接触することによって可能となる。または、滴下装置あるいは噴射装置によって担体上に試料を順次滴下または噴射することによって担体と試料を接触させることによって可能である。あるいは、流路の一部の領域または流路内に担体が存在する場合にも、流路内を複数の試料が互いに交じり合わないよう試料を流すことによって可能である。

[0148] また、本発明の担体(酵素固定化担体)を用いた診断用バイオリアクターは複数の試料を連続的に測定する場合に適している。診断用酵素を使い捨てにせず、リアクター(反応器)内に固定して反復利用するものである。診断用バイオリアクターで好適な態様としては例えば、支持体として多孔性アルキルアミンガラス(粒子サイズ125~177 μm 、孔径50nm)に本発明のポリマーをコーティングし、これにグルコース酸化酵素やコレステロール酸化酵素などを固定する。酵素分子を結合させたガラス粒子を内径0.5~1.5nm、長さ50~300mmのプラスチックチューブに充填し、その両端をナイロンネットで覆い、かつ適当な長さのニップルで止めてリアクターを作ることができる。

[0149] この診断用バイオリアクターの一方に試料の入口を、他方に反応生成物の出口を設け、出口に反応生成物を測定するためのセンサー(検出器の検出部)を設けることによってフロー式診断用バイオリアクターを作ることができる。フロー式診断用バイオリアクターは1検体ごとに試料にセンサーを投入する必要がなく、試料を1方向に送ることができるため基質および反応生成物の多方向の拡散が起きにくくなる。このことは2種以上の酵素反応を連続的に行わせる場合に特に重要であり、異なる酵素のリアクターを直線的に連結させることによって、最初の反応が不完全に行われた後に次

反応が行われる可能性を最小限に留めることができる。

- [0150] 連続的に測定する場合、前に接触した試料中の測定対象物によって生じた物質質量の変化が、後に接触した試料中の測定対象物によって生じる物質質量の変化に影響をもたらす恐れがある場合もあり、そのような場合には、適宜洗浄液によって担体に付着した前の試料を洗浄することが望ましい。
- [0151] 本発明は、前述の酵素を用いた担体を含む測定キットにも関する。測定キット中の担体以外の構成要素は、任意の公知の要素を選択することができる。すなわち、酵素反応停止液、ブロッキング剤、標準物質、測定試料希釈液、洗浄液等を任意に加えることができる。
- [0152] イムノクロマト法では、酵素固定領域を含むメンブレンを担体とし、サンプルパッド、コンジュゲートパッド、吸収パッドなどをハウジング内に配置されたテストストリップが測定キットに含まれる。測定キット中のテストストリップ以外の構成要素として、酵素反応停止液、ブロッキング剤、標準物質、測定試料希釈液、洗浄液等を任意に加えることもできる。
- [0153] 本発明の担体(酵素固定化担体)により測定可能な測定対象物としては、LDLコレステロール、HDLコレステロール、総コレステロール、遊離コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、遊離脂肪酸、過酸化脂質、クレアチニン、尿素窒素、尿酸、アンモニア、グルコース、ヘモグロビンA1c、乳酸、ピルビン酸、シアル酸、L-グルタミン酸、L-乳酸、ビタミンC、無機リン、アルコール等があげられる。
- [0154] 本発明の担体(酵素固定化担体)は、物質の生産にも適用できる。この場合、基質を担体に結合した酵素と接触させたのちに、直ちに反応生成物を含む反応液を酵素と分離することによって、反応生成物による酵素反応の阻害を低減することが長所である。本発明によって可能となる態様には、酵素によって生じた反応生成物を連続的に取り出すことも含まれる。また、さらに基質を担体と連続的に接触できる態様を組み合わせることによってさらに利便性が向上する。基質を連続的に接触させ、また反応生成物を連続的に取り出せる態様は、反応生成物の生産を連続的に行わせるための装置を簡素なものにすることを可能とする。
- [0155] 本発明の担体(酵素固定化担体)を用いた物質の生産は、例えば該担体の表面上

に基質を含む反応液を連続的に流すことにより行うことができる。該担体は、反応生成物を連続的に取り出せる生産手段および基質を担体と連続的に接触させる手段としても機能し得る。例えば、流路の一部を本発明の担体が形成している場合あるいは流路内に担体が存在する場合、基質を含む反応液を流路に流すことによって基質と担体を接触させることができる。流路の一部を本発明の担体が形成している場合の例としては、マイクロTAS (Micro-Total Analysis System) あるいはMEMS (Micro Electro Mechanical Systems) あるいはラボ・オン・ア・チップ (Lab-on-a-chip) の微小流路内に担体が設置された態様などがあげられる。流路内に担体が存在する場合の例としては、酵素リアクターやバイオリアクターのようにビーズを支持体として流路であるカラムに充填する態様などがあげられる。

[0156] また、担体(酵素固定化担体)を用いた物質の生産は、基質を含む反応液に本発明の担体を投入することによっても行うことができる。反応液の入った容器にビーズなどの担体を投入し、酵素反応を行わせた後に担体を担体の通過しないサイズの穴を有する膜で捕捉することによって、反応液と担体を分離させる手段が好適である。

[0157] 酵素反応のモニタリングを同時に行いながら酵素反応を進行させることは酵素反応が十分進行した後に反応生成物を取り出すことを可能にする手段として好ましい。この場合には、上記の測定対象物を測定する手段を具備した装置を用いることによって可能である。

[0158] 反応生成物の生産を連続的に行わせるための装置としては例えば酵素反応カラム、酵素リアクター、バイオリアクター等があげられる。反応生成物の生産を連続的に行わせるための装置としては、例えば連続攪拌反応器、充填床型反応器、流動床型反応器、膜型反応器、ホローファイバー型反応器、回転円板型反応器、磁場反応器、2相反応器などがあげられる。

[0159] 本発明によって生産できる反応生成物としては、酵素反応によって生産できるものであれば何でもよいが例えば、エタノールなどのアルコール類、ポリフェノール類、トランス-4-ヒドロキシプロリン、糖ペプチド、糖脂質、単糖、サイクロデキストリンなどの多糖、トレハロースなどのオリゴ糖、L-アスパラギン酸、L-アラニン、L-トリプトファンなどのアミノ酸、ジペプチド、アスパルテームなどのオリゴペプチド、脂質、核酸、

異性化糖等の甘味剤、イノシン酸などのうまみ物質、ジアシルグリセロールなどの食品添加物、乳糖分解乳、カゼイン分解物などの食品原料、化粧品原料、アクリルアミドなどの合成ポリマーの原料、6-アミノペニシラン、7-アミノセファアロスポリン等の抗生物質の原料、1, 4-アンドロスタジエン、4-アンドロステン等のステロイドホルモンの原料、ヒト型インスリン、ヒト型成長ホルモンなどのポリペプチド医薬品、L-ドーパ、(6S)-テトラヒドロ葉酸などの医薬品またはその原料等があげられる。

[0160] 以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を何ら限定するものではない。尚、本実施例および比較例においては、下記の試薬類を使用した。

[0161] PMMA (Polymer Source, Inc. 又は Polyscience, Inc. 製)。

これらの物性は、以下の通りである。

it-PMMA: $M_n=19,000$, $M_w=21,000$, $M_w/M_n=1.10$, $mm/mr/rr=95/2/3$

st-PMMA: $M_n=18,600$, $M_w=23,000$, $M_w/M_n=1.23$, $mm/mr/rr=10/12/78$

at-PMMA: $M_n=22,200$, $M_w=23,200$, $M_w/M_n=1.03$

(上記の略号で、 M_n は数平均分子量を表し、 M_w は重量平均分子量を表す。 $mm/mr/rr$ は立体規則性を表す三連子記号であり、 mm はアイソタクティシティーを、 rr はシンジオタクティシティーを表す。 it -PMMAはアイソタクティックPMMAを、 st -PMMAはシンジオタクティックPMMAを、 at -PMMAはアタクティックPMMAを表す。)

プロテインA (コスモバイオ社製)。プロテインA溶液は、以下のようにして調製した。

[0162] 4°Cで保存したプロテインA (M_w 42,000)を常温に戻した後、0.02 重量%のアジ化ナトリウム (NaN_3) /PBS (リン酸緩衝食塩水) 溶液 (2.38 mL) に溶解して $20 \mu\text{mol/L}$ のプロテインA溶液を調製し、4°Cで2時間静置した。このプロテインA溶液を $150 \mu\text{L}$ ずつ分取し、スピンドウンを行い液体窒素で凍結後、-20°Cで保存した。使用に際し、解凍し、PBSで希釈して $1 \mu\text{mol/L}$ とした。

[0163] 抗ヒト血清アルブミン (HSAと略記する) ウサギポリクローナル抗体 ($M_w=160,000$; SIGMA社製)。精製せずに使用した。凍結した抗体溶液を37°Cで素早く解凍してPBSで希釈して $1 \mu\text{mol/L}$ とし、4°Cで保存した。使用の際に、ポリプロピレン製サンプル管に1 mL採取した。

- [0164] PBS(Ca^{2+} , Mg^{2+} free)は、NaCl 4.00 g、KCl 0.10 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.45 g、および KH_2PO_4 0.10 gを50 mLの超純水で溶解して10倍濃縮液をストック用に作成し、4℃で保存した(10×PBS)。使用の際は、超純水で10倍に希釈した。
- [0165] HSA(HSA fatty acid free; Mw=69,000; SIGMA社製)およびウシ血清アルブミン(BSAと略記する; Mw=67,000; SIGMA社製)。精製せずに使用した。なお、HSAが抗ヒトHSA抗体に特異的な抗原であり、BSAは対照として使用した非特異抗原である。HSA及びBSA溶液は、何れも以下の様にして調製した。まず、アルブミンを室温で30分間デシケーター内に静置した後、所定量を秤量し、完全に溶解するとアルブミン濃度が10 $\mu\text{mol/L}$ となる量のPBSを加え、4℃で翌日まで静置して完全に溶解させた。さらにPBSで希釈し、1 $\mu\text{mol/L}$ とした。これらの溶液は、調製してから1週間以内に使用した。
- [0166] β -ガラクトシダーゼ[β -D-ガラクトシダーゼ;大腸菌(E.coli)由来、5～30ユニット/mL;和光純薬工業社製]。
- [0167] p-ニトロフェニルガラクトピラノシド(PNPG;和光純薬工業社製)。

実施例1

プロテインA(分子結合用物質)固定担体の製造

支持体/ステレオコンプレックスからなるポリマー膜/プロテインAの調製は以下の通り行った。

- [0168] 基本振動数9 MHzのAT-カット水晶発振子(QCM)チップを支持体とし、該支持体上にit-PMMAとst-PMMAとのステレオコンプレックスのポリマー膜を有する担体を以下のように作製した。なお、QCMチップには金薄膜が成膜されており、ポリマー膜は該金薄膜上に形成された。
- [0169] まず、QCMチップをPiranha液(硫酸:30重量%過酸化水素水=3:1)による2分間の処理を各面2回ずつ行って洗浄し、振動数を測定した。
- [0170] このQCMチップを1.7 mg/mLのit-PMMA溶液(溶媒:アセトニトリル)に25℃で5分間浸漬し、引き上げ、アセトニトリル(特級)で洗浄し、次いで超純水で洗浄し、窒素ガスで乾燥させた。続いて、1.7 mg/mLのst-PMMA溶液(溶媒:アセトニトリル)に25℃で5分間浸漬し、引き上げ、アセトニトリル(特級)で洗浄し、次いで超純水で洗浄し、窒素ガスで乾燥させた。この操作を1サイクルとし、このサイクルを繰り返し、計14回

行った。このようにして、ポリマー膜を形成した。

[0171] このポリマー膜に、スピンコート法でプロテインAを固定した。1 μ mol/LのプロテインA溶液に、上記のポリマー膜を形成した支持体を37°Cで60分間浸漬し、超純水で洗浄し、乾燥し、担体を作製した。

[比較例1] 支持体／ステレオコンプレックスからなるポリマー膜(プロテインAなし)
プロテインAの固定を省略した点を除き、実施例1と同様にして測定用担体を調製した。

[比較例2～4] 支持体／単独ポリマー膜(プロテインAなし)
実施例1と同様のQCMチップを支持体とし、それぞれ該支持体上にit-PMMA単独(比較例2)、st-PMMA単独(比較例3)、at-PMMA(比較例4)で構成されるポリマー膜を形成した支持体を用いて測定用担体を調製した。

[0172] it-PMMA、st-PMMA、およびat-PMMA溶液は、それぞれ1.7 mgのPMMAをサンプル管に秤量し、濃度が1.7 mg/mLとなるようクロロホルム(紫外吸収スペクトル用試薬、ナカライ社製)を加え、室温で1時間静置して完全に溶解することによって調製した。これら溶液は、使用まで-20°Cで保管した。ポリマー膜作製時には、室温に戻して1時間静置した後を使用した。

[0173] ポリマー膜の作製は、上記のit-PMMA、st-PMMA、及びat-PMMA溶液(溶媒:クロロホルム)を支持体上にパスツールピペットで1滴マウントし、スピンコート(2000 rpm, 60 s)することによって行った。スピンコートの後、超純水で洗浄を繰り返し、振動数が安定したのを確認してから乾燥した。

[比較例5] 支持体のみ(ポリマー膜およびプロテインAなし)

QCMチップをPiranha液で洗浄後乾燥しそのまま測定用担体とした。

[比較例6～8] 支持体／単独ポリマー膜／プロテインA

比較例2～4の測定用担体に、さらにプロテインAを固定した。比較例6～8ではポリマー膜がそれぞれit-PMMA単独(比較例6)、st-PMMA単独(比較例7)、at-PMMA(比較例8)である。プロテインAの固定は実施例1と同様に行った。固定されたプロテインA量を決定するために、プロテインAの固定の前後で振動数を測定した。

[比較例9] 支持体／プロテインA

比較例5の測定用担体にプロテインAを固定した。プロテインAの固定は、実施例1と同様に行い、乾燥し担体を調製した。固定されたプロテインA量を決定するために、プロテインAの固定の前後で振動数を測定した。

[0174] なお、実施例1及び比較例1～9で調製した担体の構成を表1に示す。

[0175] [表1]

表1 測定用担体の構成

実施例1	支持体／it-PMMA+st-PMMA ステレオコンプレックス膜／プロテインA
比較例1	支持体／it-PMMA+st-PMMAステレオコンプレックス膜
比較例2	支持体／it-PMMA単独膜
比較例3	支持体／st-PMMA単独膜
比較例4	支持体／at-PMMA単独膜
比較例5	支持体
比較例6	支持体／it-PMMA単独膜／プロテインA
比較例7	支持体／st-PMMA単独膜／プロテインA
比較例8	支持体／at-PMMA単独膜／プロテインA
比較例9	支持体／プロテインA

[0176] [試験例1] 各測定用担体におけるプロテイン固定量

実施例1、比較例6～9で作製した担体について、プロテインAの固定の前後で振動数を測定し、その振動数の差をもって固定されたプロテインA量(プロテインA固定量)を決定した。固定されたプロテインA量(プロテインA固定量)を振動数の変化量として、以下の表2に示す。

[0177] [表2]

表2 各測定用担体におけるプロテインA固定化量/Hz

測定用担体	振動数変化 / Hz
実施例1(ステレオコンプレックス) (n=27)	74±4
比較例6(it-PMMA) (n=27)	39±7
比較例7(st-PMMA) (n=15)	45±7
比較例8(at-PMMA) (n=15)	43±4
比較例9(ポリマー膜なし)	78±7

[0178] 表2に示す通り、it-PMMA(比較例6)及びst-PMMA(比較例7)の単独膜及びat-PMMA(比較例8)と比較して、実施例1のようにステレオコンプレックス膜を用いることによりプロテインA固定量は増加した。実施例1のようにステレオコンプレックス膜を用いた場合と、比較例9のようにポリマー膜がない場合とではプロテインA固定量はほぼ同じであった。

実施例2

抗ヒトHSA抗体結合担体の調製

実施例1で調製した担体を37℃において1 μ mol/Lの抗ヒトHSA抗体溶液に60分間浸漬し、抗体を結合させた。次いで溶液から取り出して37℃の超純水で洗浄し、乾燥させずにPBS溶液に1時間浸漬し、さらに37℃の超純水で洗浄し、乾燥し抗ヒトHSA抗体結合担体を製造した。

[試験例2] プロテインA固定の抗体及び抗原結合量に及ぼす効果

実施例1(プロテインA固定処理済み)、比較例1～3及び5(プロテインA固定処理なし)で調製された測定用担体に抗体を結合させ、その結合量を評価した。また、更に抗原を結合させその結合量を評価しプロテインA固定の抗体及び抗原結合量に及ぼす効果を試験した。

[0179] 抗体結合量の評価は以下の通り行った。

[0180] 実施例1及び比較例1～3及び5～9は予め振動数を測定し、初期値とした。抗体

の結合は、以下のようにして行った。まず、各測定用担体を37℃において1 μ mol/Lの抗ヒトHSA抗体溶液に60分間浸漬し、抗体を結合させた後、溶液から取り出して37℃の超純水で洗浄した。この測定用担体を乾燥させずにPBS溶液に1時間浸漬し、37℃の超純水で洗浄し、乾燥した。その後、振動数を測定し、初期値との差によって抗体結合量を評価した。抗原結合量の評価は以下の通り行った。

[0181] 測定用担体を37℃において1 μ mol/Lの抗体溶液に60分間浸漬して抗体を結合させた後、溶液から取り出して37℃の超純水で洗浄した。この測定用担体を乾燥させずに37℃で1 μ mol/LのHSA溶液又はBSA溶液に1時間浸漬し、抗原を結合させた後、溶液から取り出して37℃の超純水で洗浄、乾燥した。その後、振動数を測定し、初期値との差によって抗体＋抗原結合量を決定した。前述の抗体結合量との差から、抗原結合量を決定した。なお、HSAは今回使用した抗体の抗原であり、測定対象とする測定対象物にあたる。一方、BSAは該抗体には結合しない非特異抗原であり、比較のため実験を行った。

[0182] 抗体結合量及び抗原結合量の結果を表3に示す。結合量は振動数変化(Hz)で表記した。1モルの抗体当たりに結合するHSAの平均モル数(表中でHSA/抗体と表記)は、抗体結合量及びHSA結合量並びに各々の分子量から計算で求めた。

[0183] [表3]

表3 プロテインAの効果
各測定用担体における抗体及び抗原結合量

測定用担体	抗体 (n=3)	抗体 +HSA (n=3)	抗体 +BSA (n=1)	HSA	BSA	HSA/抗体**
実施例1* (ステレオコンプレックス膜/プロテインA)	167±12	213±5	179±11	46±5	12±11	0.62
比較例1 (ステレオコンプレックス膜)	102±2	109±8	115	7±8	13	0.18
比較例2 (it-PMMA膜)	66±13	67±5	64	1±5	-2	-
比較例3 (st-PMMA膜)	79±6	85±5	90	6±5	11	0.14
比較例5 (ポリマー膜なし)	94±5	107±4	106	13±4	12	0.31

結合量は全て振動数変化(Hz)で表記した。

実施例1はプロテインAを固定化しており、比較例1～3及び5はプロテインAを固定化していない

* 実施例1については、n=5で測定を行った。

** HSA/抗体比は振動数の変化から計算したモル比である。

[0184] 表3に示す通り、プロテインAを固定することによって抗体結合量が増加するだけでなく、抗体当たりの特異抗原の結合比(HSA/抗体)も増加することがわかる。この結果は、プロテインAを介在させることによって抗体の変性を抑制できること、及び／又は抗体の吸着状態を制御して抗原の結合を促進していることを示唆している。

[試験例3] ポリマー膜の抗体及び抗原結合量に及ぼす効果

実施例1、比較例6～9の測定用担体(何れもプロテインAが固定されている)で調製された測定用担体を用いて抗体を結合させ、抗体結合量を評価した。また、更に抗原を結合させ抗原結合量を評価しポリマー膜の影響を比較した。抗体結合量及び抗原結合量の結果を表4に示す。結合量は振動数変化(Hz)で表記した。1モルの抗体当たりに結合するHSAの平均モル数(表中でHSA/抗体と表記)は、抗体結合量及びHSA結合量並びに各々の分子量から計算で求めた。

[0185] [表4]

表4 ポリマー膜の効果
各測定用担体における抗体及び抗原結合量

測定用担体	抗体 (n=5)	抗体 +HSA (n=5)	抗体 +BSA (n=5)	HSA	BSA	HSA/抗体**
実施例1* (ステレオコンプレックス膜)	167±12	213±5	179±11	46±5	12±11	0.62
比較例6 (it-PMMA膜)	116±10	143±13	126±14	27±13	10±14	0.55
比較例7 (st-PMMA膜)	117±9	140±9	128±5	23±9	12±5	0.45
比較例8 (at-PMMA膜)	114±8	129±6	120±3	15±6	6±3	0.32
比較例9 (ポリマー膜なし)	134±10	156±11	137±12	22±11	3±12	0.39

結合量は全て振動数変化(Hz)で表記した。
何れの測定用担体にもプロテインAが固定化されている。
** HSA/抗体比は振動数の変化から計算したモル比である。

[0186] 表4に示す通り、it-PMMAの単独膜(比較例6)及びst-PMMAの単独膜(比較例7)及びat-PMMA(比較例8)と比較して、ステレオコンプレックス膜を用いることにより、抗体結合量、及び、該抗体に特異的な抗原であるHSA結合量が増加し、HSA/抗体比も増加することがわかる。従って、本発明の測定用担体は、微量の測定対象物を効率よく測定できるという優れた性能を示すと考えられる。

[試験例4] HSA測定用担体の保存安定性

実施例1、比較例6、比較例9の測定用担体について、調製後に一定期間保存してから試験例2と同様な方法で抗体結合量及び抗原結合量を測定し、性能の経時変化を調べた。保存条件は、室温にて遮光したシリカゲル入りの容器中に保存するというものであり、保存開始から1日、3日、5日、及び10日後に測定を行った。10日後の結果を表5に示す。

[0187] [表5]

表5 測定用担体の保存安定性

測定用担体	HSA結合量 (保存開始時)	HSA結合量 (10日後)	保持率(%)*
実施例1 (ステレオコンプレックス膜)	46	40	87.0
比較例6 (it-PMMA膜)	26	3	11.5
比較例9 (ポリマー膜なし)	22	12	54.5

結合量は全て振動数変化(Hz)で表記した。
何れの測定用担体も、プロテインAが固定化されている。

* 10日後のHSA結合量(Hz) / 保存開始時のHSA結合量 × 100 (%)

[0188] ステレオコンプレックス膜を用いると、10日保存後のHSA結合量が当初の87%であるのに対し、it-PMMA単独膜(比較例6)を用いた場合及びポリマー膜を用いなかった場合(比較例9)には、それぞれ12%及び55%に減少した。今回の保存条件は、通常の担体の保存条件と比較すると過酷なものであり、このような保存条件下でも劣化が抑制されていることから、本発明の担体が優れた保存安定性を有していることがわかる。

実施例3

HSA測定用担体によるHSAの定量

実施例1で調製した担体は予め振動数を測定し、初期値とした。抗体の結合は、以下のようにして行った。まず、各測定用担体を37℃において1 μ mol/Lの抗ヒトHSA抗

体溶液に60分間浸漬し、抗体を結合させた後、溶液から取り出して37℃の超純水で洗浄した。この測定用担体を乾燥させずにPBS溶液に1時間浸漬し、37℃の超純水で洗浄し、乾燥した。その後、振動数を測定し、初期値との差によって抗体結合量を評価した。

- [0189] 抗原の結合は以下のようにして行った。測定用担体を37℃において1 μ mol/Lの抗体溶液に60分間浸漬して抗体を結合させた後、溶液から取り出して37℃の超純水で洗浄した。この測定用担体を乾燥させずに、0.1、0.5、1.0、5.0 μ mol/Lの濃度に調整したHSA抗原を含有する試料溶液に37℃で1時間浸漬し、HSA抗原を結合させた後、溶液から取り出して37℃の超純水で洗浄、乾燥した。HSA抗原を結合させずに37℃の超純水で洗浄、乾燥したものも調製した。その後、振動数を測定し、初期値との差によって抗ヒトHSA抗体とHSA抗原の結合量を決定した。前述の抗ヒトHSA抗体結合量との差から、HSA抗原結合量を決定した。HSA抗原結合量とHSA抗原濃度との関係を表す検量線を図3に示す。結合量は振動数変化(Hz)で表記した。

[比較例10]

実施例1の担体に代えて、比較例6の担体を用いて実施例3と同様な方法によりHSA抗原結合量とHSA抗原濃度との関係を表す検量線を作成した。ただし、HSA抗原濃度は0.5、1.0、5.0 μ mol/Lとした。結果を図3に示す。

[比較例11]

実施例1の担体に代えて、比較例9の担体を用いて実施例3と同様な方法によりHSA抗原結合量とHSA抗原濃度との関係を表す検量線を作成した。ただし、HSA抗原濃度は0.5、1.0、5.0 μ mol/Lとした。結果を図3に示す。

- [0190] 実施例3、比較例10および比較例11の結果、実施例1のステレオコンプレックス膜を用いた担体では、HSA抗原濃度依存的にHSA抗原結合量が増加することが確認された。従ってあらかじめ検量線を作成することにより、未知濃度の試料溶液から得られる振動数変化(Hz)をHSA抗原濃度に換算することができ、HSA抗原濃度を定量することができる。

- [0191] なお、ステレオコンプレックス膜を用いた担体は、it-PMMA単独膜(比較例6)を用いた場合及びポリマー膜を用いなかった場合(比較例9)に比較して、同濃度のHSA

抗原濃度に対してHSA抗原結合量が増加している。このことはHSA抗原の定量に用いる担体としてステレオコンプレックス膜を用いた担体は優れていることを示している。

実施例4

β -ガラクトシダーゼ結合担体の調製

β -ガラクトシダーゼ結合担体の調製

0.0025～1 μ mol/Lとなるように β -ガラクトシダーゼを1mmol/L塩化マグネシウムを含む50mmol/Lリン酸緩衝液に溶解し、 β -ガラクトシダーゼ溶液を作製した。各濃度の該 β -ガラクトシダーゼ溶液に、比較例1のit-PMMA単独で構成されるポリマー膜を形成したQCMチップを室温で60分間浸漬し、50mmol/Lリン酸緩衝液で3回洗浄し、乾燥し、 β -ガラクトシダーゼ結合担体を作製した。

[比較例12]

β -ガラクトシダーゼ結合担体の調製

0.0025～1 μ mol/Lとなるように β -ガラクトシダーゼを1mmol/L塩化マグネシウムを含む50mmol/Lリン酸緩衝液に溶解し、 β -ガラクトシダーゼ溶液を作製した。各濃度の該 β -ガラクトシダーゼ溶液に、比較例2のit-PMMA単独で構成されるポリマー膜を形成したQCMチップを室温で60分間浸漬し、50mmol/Lリン酸緩衝液で3回洗浄し、乾燥し、 β -ガラクトシダーゼ結合担体を作製した。

[試験例5] β -ガラクトシダーゼ結合量に及ぼす効果

β -ガラクトシダーゼを結合する前の比較例1および比較例2の振動数を予め測定した。次いで、 β -ガラクトシダーゼを結合した後の実施例4および比較例12の振動数を測定し、振動数変化量($-\Delta F$ 、単位Hz)を求めた。サウアーブレイ(Sauerbrey)の式(式1)を用いて、振動数変化量から水晶振動子電極に結合した β -ガラクトシダーゼ結合量を計算で求めた。

式1

[0192]

$$-\Delta F = \frac{2F_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}} \times \Delta m$$

[0193] ただし、 ΔF は振動数変化量、 F_0 は基本振動数、 Δm は β -ガラクトシダーゼ結合量、 A は電極の面積、 ρ_q は水晶の密度、 μ_q は水晶のせん断応力である。

[0194] 水晶振動子電極に結合した β -ガラクトシダーゼ結合量(Δm 、単位ng)を電極の面積で割ることによって、 1cm^2 当りの β -ガラクトシダーゼ結合量を計算で求めた。浸漬に用いた β -ガラクトシダーゼ溶液の各濃度に対する、振動数変化量と 1cm^2 当りの β -ガラクトシダーゼ結合量を表6にまとめた。

[0195] [表6]

β -ガラクトシダーゼ溶液の濃度 (μM)	実施例4		比較例12	
	振動数変化量 (Hz)	β -ガラクトシダーゼ結合量 (ng/cm^2)	振動数変化量 (Hz)	β -ガラクトシダーゼ結合量 (ng/cm^2)
0.0125	71 ± 12	195 ± 33	62 ± 16	170 ± 44
0.025	108 ± 2	296 ± 5	94 ± 6	258 ± 16
0.05	144 ± 9	395 ± 25	121 ± 1	332 ± 3
0.125	167 ± 16	458 ± 44	121 ± 4	332 ± 11
0.25	169 ± 6	463 ± 16	136 ± 6	373 ± 16
0.5	171 ± 1	469 ± 3	132 ± 12	362 ± 33
1	187 ± 5	512 ± 14	143 ± 6	392 ± 16

[0196] β -ガラクトシダーゼ溶液の濃度を横軸に、 1cm^2 当りの β -ガラクトシダーゼ結合量を縦軸としてデータをプロットしたときの結果を図4に示した。

[0197] 実施例4、比較例12のいずれも β -ガラクトシダーゼ溶液の濃度に依存して、QCMチップに結合した β -ガラクトシダーゼ量は増加したが、 β -ガラクトシダーゼ溶液の濃度が $0.25\mu\text{mol/L}$ 以上では、 β -ガラクトシダーゼ結合量は飽和し、それ以上増加しなかった。この結果から、QCMチップに結合させる β -ガラクトシダーゼ量を飽和させるためには、 $0.25\mu\text{mol/L}$ 以上の濃度の β -ガラクトシダーゼ溶液に浸漬すればよいことがわかる。

[0198] 実施例4、比較例12の各場合において、ラングミュア (Langmuir) の吸着等温式(

式2)に近似して見かけ上の結合定数(K_{app})を求めた。

式2

[0199]

$$A = \frac{K_{app} A_{max}}{1 + K_{app} [\beta - GAL]} [\beta - GAL]$$

[0200] ただし、Aは β -ガラクトシダーゼの結合量、 A_{max} は β -ガラクトシダーゼの最大結合量、 K_{app} は見かけ上の結合定数、 $[\beta - Gal]$ は β -ガラクトシダーゼの濃度である。

[0201] β -ガラクトシダーゼの最大結合量(A_{max})と結合定数(K_{app})を表7にまとめた。 R^2 は相関係数を表す。

[0202] [表7]

担体	A_{max} (ng/cm ²)	K_{app} ($\times 10^7 M^{-1}$)	R^2
実施例4	508	5.65	0.99
比較例12	388	7.44	0.99

[0203] ステレオコンプレックスのポリマー膜を用いた実施例4は、it-PMMA単独のポリマー膜を用いた比較例12と比較して、 β -ガラクトシダーゼの最大結合量は大きく、結合定数は小さくなるが、その差はわずかであった。実施例4の β -ガラクトシダーゼの最大結合量は、比較例12の最大結合量と比較してわずか1.3倍であった。

実施例5 β -ガラクトシダーゼ結合プレートの調製

ヌンク社製96ウェルマキシソーププレートの各ウェルに、1.7 mg/mLのit-PMMA溶液(溶媒:アセトニトリル)200 μ Lを添加し25°Cで5分間インキュベートした後、it-PMMA溶液を除去し、アセトニトリル(特級)で洗浄し、次いで超純水で洗浄し、窒素ガスで乾燥させた。続いて、1.7 mg/mLのst-PMMA溶液(溶媒:アセトニトリル)200 μ Lを添加し25°Cで5分間インキュベートした後、st-PMMA溶液を除去し、アセトニトリル(特級)で洗浄し、次いで超純水で洗浄し、窒素ガスで乾燥させた。この操作を1サイクルとし、このサイクルを繰り返し、計7回行った。このようにして、96ウェルマキシソーププレートの各ウェルにステレオコンプレックスからなるポリマー膜を形成した。ステレオ

コンプレックスからなるポリマー膜を形成したウェルに、 $0.125 \sim 1 \mu\text{mol/L}$ に調製した上記 β -ガラクトシダーゼ溶液 $150 \mu\text{L}$ を添加し、室温で1時間インキュベートした。 β -ガラクトシダーゼ溶液を除去し、 50mmol/L リン酸緩衝液で3回洗浄し、乾燥し、測定用担体を作製した。

[比較例13～14]

β -ガラクトシダーゼ結合プレートの調製

ヌンク社製96ウェルマキシソーププレートを支持体とし、 1.7 mg/mL のit-PMMA溶液(溶媒:アセトニトリル) $50 \sim 100 \mu\text{L}$ を添加し 25°C で一晩インキュベートした後、it-PMMA溶液を除去し、窒素ガスで乾燥させた。実施例5と同様に、it-PMMAのポリマー膜を形成したウェルに、 $0.125 \sim 1 \mu\text{mol/L}$ に調製した上記 β -ガラクトシダーゼ溶液 $150 \mu\text{L}$ を添加し、室温で1時間インキュベートした。 β -ガラクトシダーゼ溶液を除去し、 50mmol/L リン酸緩衝液で3回洗浄し、乾燥し、測定用担体を作製した。これを比較例13とした。ポリマー膜を形成させていないヌンク社製96ウェルマキシソーププレートのウェルに実施例5と同様の方法により β -ガラクトシダーゼを固定したものを調製し、比較例14とした。

[試験例6]

β -ガラクトシダーゼの活性を測定するために、実施例5、比較例13および比較例14で調製したウェルに、 β -ガラクトシダーゼの基質であるp-ニトロフェニルガラクトピラノシド(以下、PNPGと略す)溶液を添加し、PNPGが分解して生じた発色物質の量を比色定量した。PNPGを 0.1mol/L リン酸緩衝液(3.36mmol/L メルカプトエタノール、 30mmol/L 塩化マグネシウムを含む)に添加して、 2mmol/L PNPG溶液を調製した。PNPG添加直後の 405nm の波長の吸光度を測定し、それ以降PNPG添加後1分ごとに 405nm の波長の吸光度を測定した。実験は3ウェルについて行い、その平均値を計算した。固定するために用いた β -ガラクトシダーゼ溶液の濃度が 0.125 、 0.25 、 0.5 、 $1 \mu\text{mol/L}$ の各場合について、PNPG添加後の時間に対する波長 405nm の吸光度をプロットしたものを図5に示した。

[0204] 実施例5、比較例13、14のいずれの場合においても、時間経過とともに酵素反応が進むが、実施例5のステレオコンプレックスからなるポリマー膜の場合が最も活性値

が高くなった。図5の5～20分間の吸光度変化を、 β -ガラクトシダーゼの各濃度における96ウェルマキシソーププレートのウェルに固定された β -ガラクトシダーゼの結合量で割ることによって、単位量(mg)および単位時間当たり(分)の β -ガラクトシダーゼ活性を求めて表8にまとめた。96ウェルマキシソーププレートのウェルに固定された β -ガラクトシダーゼの結合量は、ウェル内の β -ガラクトシダーゼ溶液の接触する面積を計算で求め、該面積値に表6の 1cm^2 当りの β -ガラクトシダーゼ結合量を乗じることによって計算できる。

[0205] [表8]

β -ガラクトシダーゼ濃度	担体	吸光度変化	速度(／分・mg)
1 μM	実施例5	1. 99 $\pm$ 0. 11	314
	比較例13	0. 59 $\pm$ 0. 09	118
	比較例14	0. 28 $\pm$ 0. 02	—
0. 5 μM	実施例5	1. 76 $\pm$ 0. 20	288
	比較例13	0. 56 $\pm$ 0. 01	126
	比較例14	0. 32 $\pm$ 0. 01	—
0. 25 μM	実施例5	2. 03 $\pm$ 0. 06	341
	比較例13	0. 29 $\pm$ 0. 07	57
	比較例14	0. 17 $\pm$ 0. 10	—
0. 125 μM	実施例5	1. 87 $\pm$ 0. 34	324
	比較例13	0. 22 $\pm$ 0. 01	42
	比較例14	0. 13 $\pm$ 0. 01	—

[0206] 表8の結果は、実施例5のステレオコンプレックスからなるポリマー膜に固定された β -ガラクトシダーゼは、比較例13のit-PMMAのポリマー膜に固定された β -ガラクトシダーゼ、及び比較例14のポリマー膜のないウェルに固定された β -ガラクトシダーゼよりも活性が維持されていることを示している。この β -ガラクトシダーゼ活性の維持は、 β -ガラクトシダーゼを固定するときの β -ガラクトシダーゼ溶液の濃度に無関係であることも示している。

[0207] [試験例7] β -ガラクトシダーゼ固定担体の保存安定性

β -ガラクトシダーゼを固定したマキシソープである実施例5、比較例13および14の担体について、調製後に一定期間保存してから試験例6と同様な方法で β -ガラクトシダーゼ活性を測定し、性能の経時変化を調べた。保存条件は、室温にて遮光したシリカゲル入りの容器中に保存するというものであり、保存開始から7日後に測定を

行った。固定するために用いた β -ガラクトシダーゼ溶液の濃度が $1 \mu\text{mol/L}$ の場合について、PNPG添加後の時間に対する波長405nmの吸光度をプロットしたものを図6に示した。

[0208] 実施例5、比較例13、14のいずれの場合においても、時間経過とともに活性値が増加するが、実施例5のステレオコンプレックスからなるポリマー膜の場合が最も活性値が高くなった。図6の5～20分間の吸光度変化より、単位量(mg)および単位時間当り(分)の β -ガラクトシダーゼ活性を求めて表9にまとめた。

[0209] [表9]

β -ガラクトシダーゼ濃度	担体	吸光度変化	速度 (／分・mg)
$1 \mu\text{M}$	実施例5	0.29 ± 0.11	46
	比較例13	0.05 ± 0.01	10
	比較例14	0.03 ± 0.01	—

[0210] 実施例5、比較例13、14のいずれの場合も、7日間の保存によって保存前の活性よりも低下することが明らかとなったが、比較例13の場合には、保存前の活性値を100%とすると7日後の活性値が8.5%となるのに対して、実施例5の場合は、保存前の活性値を100%とすると7日後の活性値は14.6%となり、実施例5の方が減少率が少ない。このことから実施例5のステレオコンプレックス上に固定した β -ガラクトシダーゼの方がより活性が保たれていると考えられる。

産業上の利用可能性

[0211] 本発明の測定用担体は、支持体上に、異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体が形成されているため、ポリマー会合体上に固定されたプロテインAの変性が抑制され、優れた保存安定性を示す。さらに、単位面積あたりの抗体結合量及び抗原結合量が増加するため、測定精度や感度の向上、及び微量試料の迅速な測定等を実現することができる。従って、本発明により、病気の診断などに有用な測定対象物測定用担体、測定方法および測定用キットが提供される。

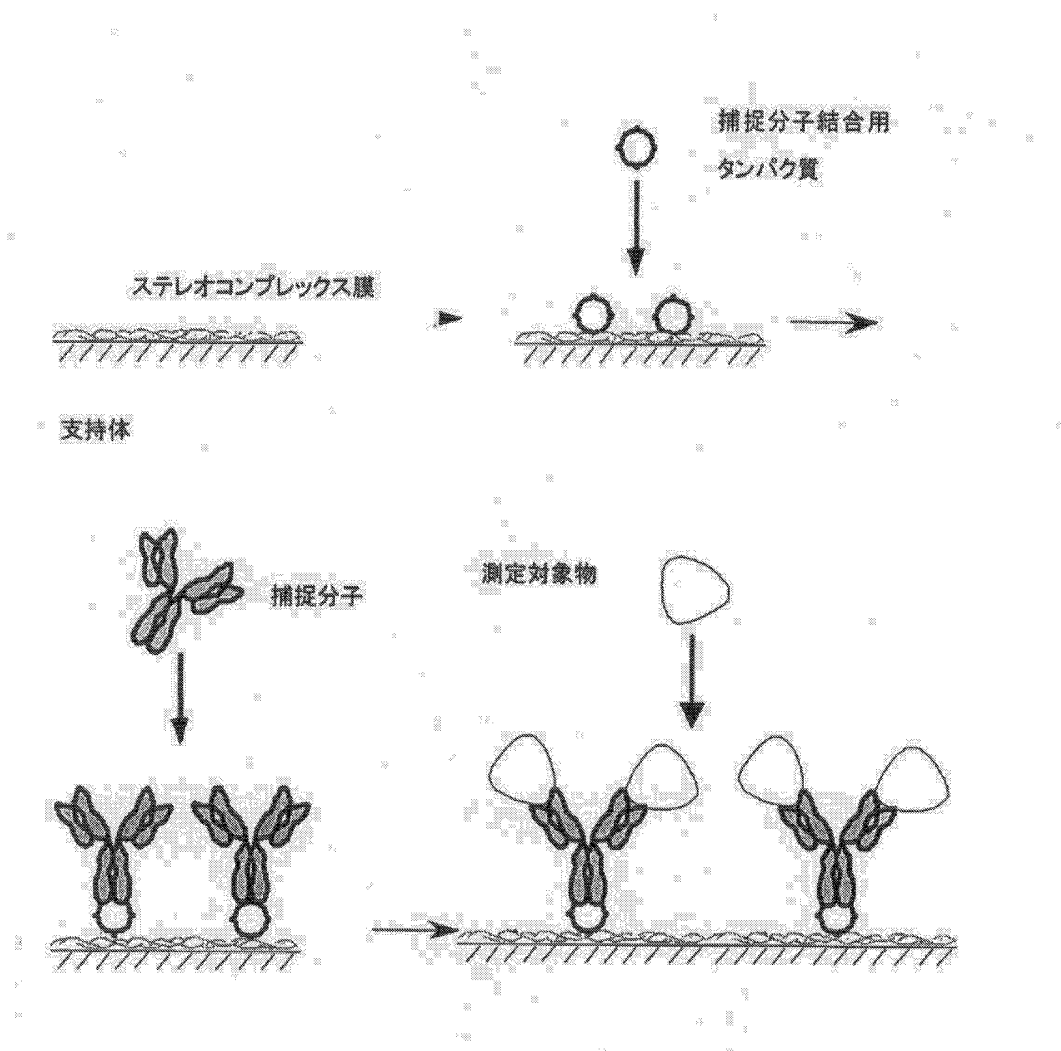
請求の範囲

- [1] 異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体領域を表面に有する支持体と、該支持体の会合体領域に固定された、分子結合用物質とを含む、試料中の測定対象物を測定するための担体。
- [2] 該会合体が立体相補的な会合を形成する会合体を含む請求項1記載の担体。
- [3] 立体規則性を有する2以上のポリマーが、シンジオタクティックポリマーとアイソタクティックポリマーとを含む請求項1又は2記載の担体。
- [4] 該会合体がらせん構造又はファンデルワールス構造を含む会合体である請求項1～3の何れかに記載の担体。
- [5] 該ポリマーの少なくとも一つがポリメタクリレートである請求項1～4の何れかに記載の担体。
- [6] ポリメタクリレートがポリメチルメタクリレート、ポリエチルメタクリレート、ポリイソプロピルメタクリレート又はポリn-プロピルメタクリレートである請求項5記載の担体。
- [7] 支持体がプレート、チップ、ビーズ、繊維又はメンブレンの形態にある請求項1～6の何れかに記載の担体。
- [8] 該担体がブロッキング剤によりブロッキング処理されたものである請求項1～7のいずれかに記載の担体。
- [9] 分子結合用物質が、酵素である請求項1～8の何れかに記載の担体。
- [10] 分子結合用物質が、捕捉分子結合用タンパク質である請求項1～8の何れかに記載の担体。
- [11] 捕捉分子結合用タンパク質が、プロテインA、プロテインG、又はプロテインLである請求項10記載の担体。
- [12] 請求項10又は11記載の担体に、捕捉分子が該捕捉分子結合用タンパク質を介して結合している、試料中の測定対象物を測定するための捕捉分子結合担体。
- [13] 請求項1～12の何れかに記載の担体を含む測定対象物測定用試薬。
- [14] 請求項1～12の何れかに記載の担体を含む測定対象物測定用キット。
- [15] 異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体領域を表面に有する支持体を含む試薬、及び分子結合用物質を含む試薬を含有する、試料中の測定対象物の測

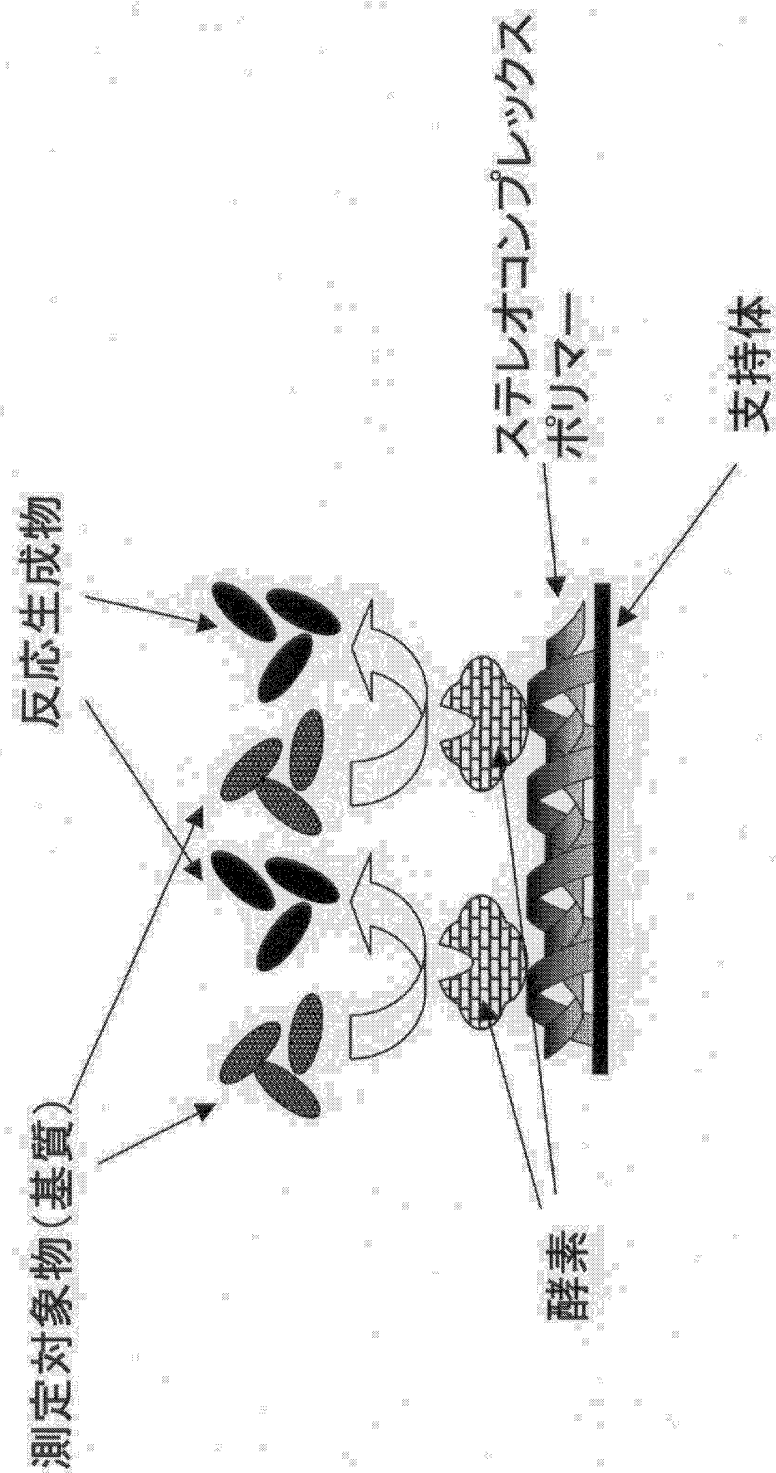
定用キット。

- [16] さらに捕捉分子を含む試薬を含有する請求項15に記載の測定用キット。
- [17] 請求項10又は11に記載の担体と、捕捉分子とを接触させ、捕捉分子結合担体を形成させる工程、該捕捉分子結合担体と測定対象物とを接触させ捕捉分子を介して該測定対象物を担体に結合させる工程、及び該担体に結合した測定対象物を測定する工程を含む、試料中の測定対象物の測定方法。
- [18] 捕捉分子と測定対象物とを接触させ、測定対象物結合捕捉分子を形成させる工程、請求項10又は11に記載の担体と測定対象物結合捕捉分子とを接触させ該測定対象物を担体に結合させる工程、及び該担体に結合した測定対象物を測定する工程を含む、試料中の測定対象物の測定方法。
- [19] 請求項9に記載の担体と、測定対象物とを接触させ、該測定対象物と担体に固定された酵素とを反応させる工程、及び該反応により増加又は減少する物質の変化量を測定する工程を含む、試料中の測定対象物の測定方法。
- [20] 請求項12に記載の担体と測定対象物とを接触させ、捕捉分子を介して該測定対象物を担体に結合させる工程、及び該担体に結合した測定対象物を測定する工程を含む、試料中の測定対象物の測定方法。
- [21] 異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体領域を表面に有する支持体の会合体領域に分子結合用物質を固定することを特徴とする、試料中の測定対象物を測定するための担体の製造方法。
- [22] 異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体領域を表面に有する支持体の会合体領域に分子結合用物質を固定する工程、及び捕捉分子を該分子結合用物質に結合する工程を含む、試料中の測定対象物を測定するための捕捉分子結合担体の製造方法。
- [23] 支持体表面上の、異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体領域に、分子結合用物質を固定して試料中の測定対象物を測定するための担体用に用いられる、異なる立体規則性を有する2以上のポリマーの会合体領域を表面に有するポリマー付着支持体。

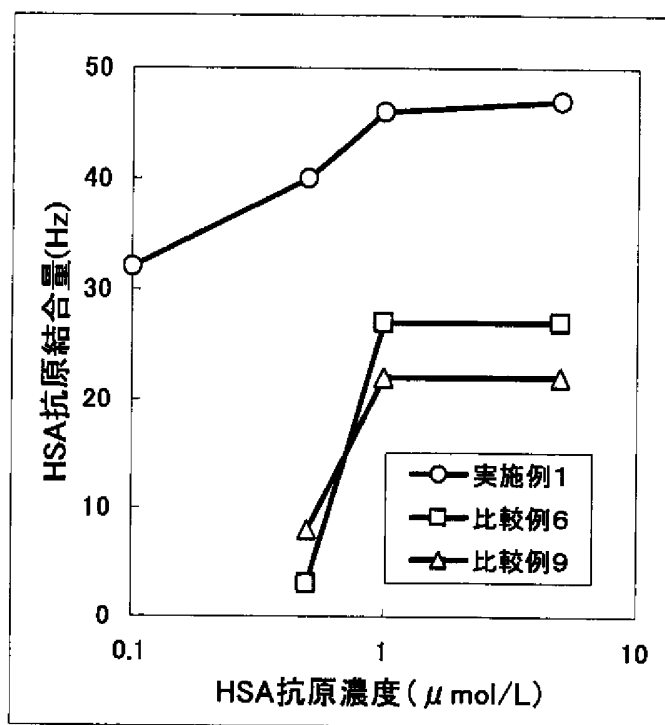
[図1]



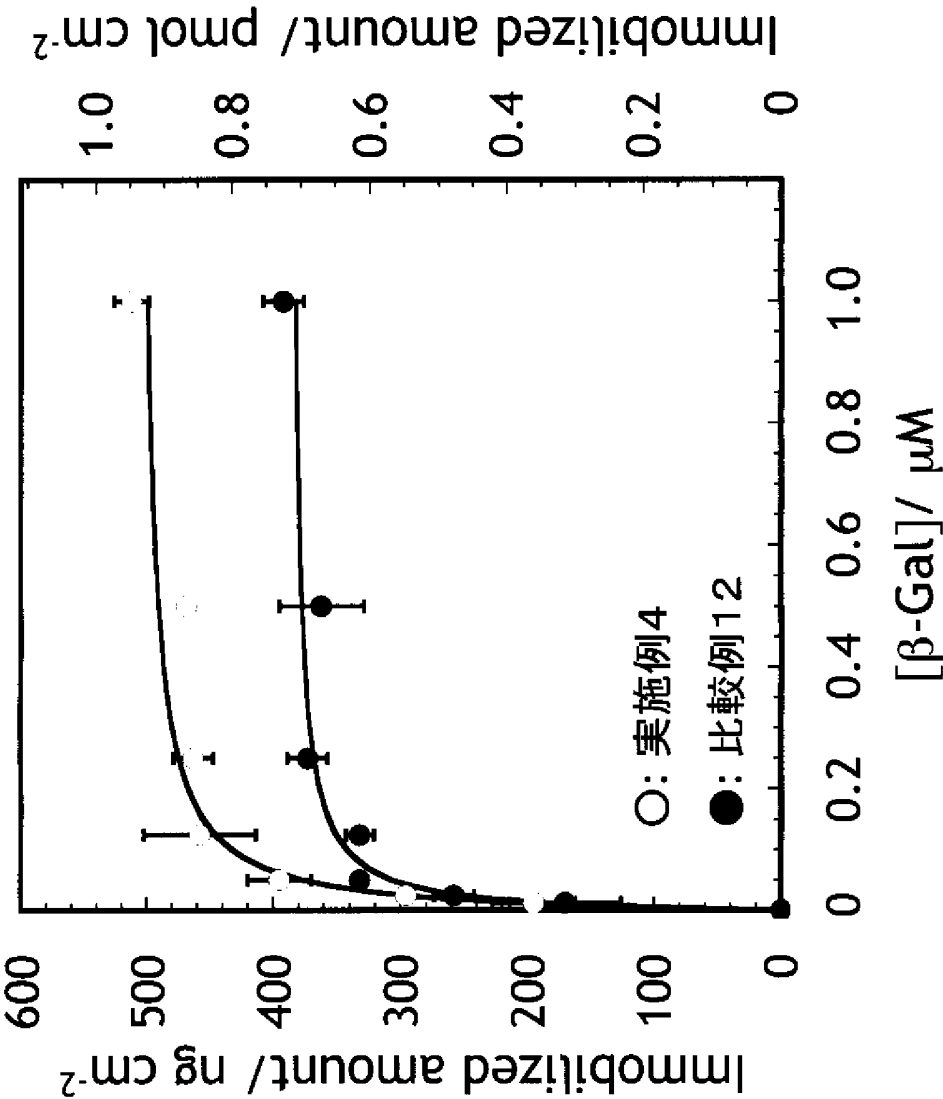
[図2]



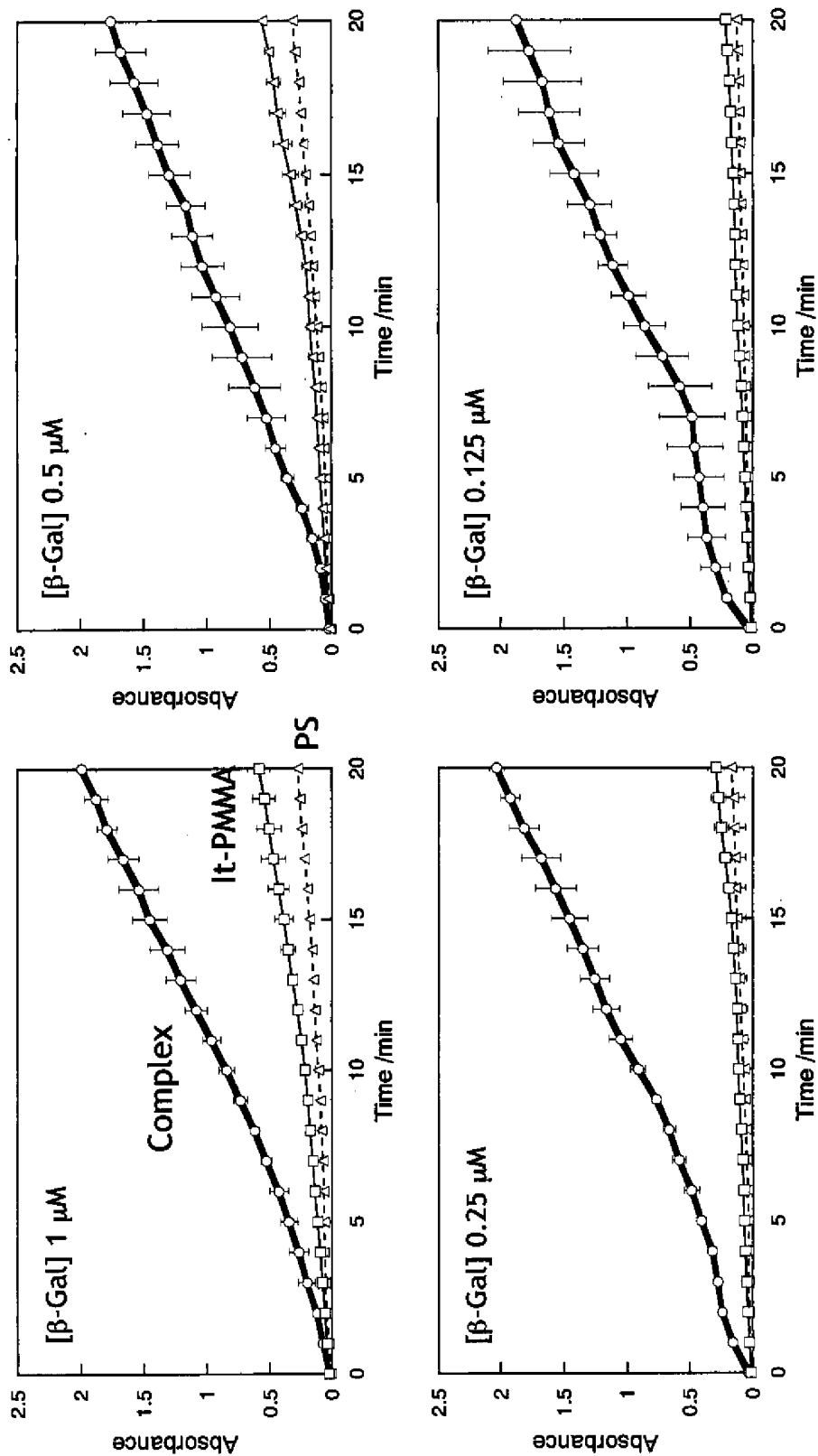
[図3]



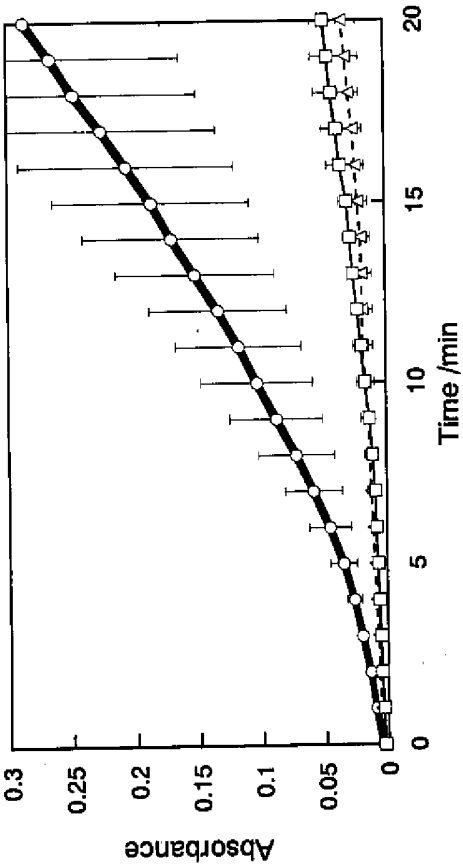
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/302993

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/545(2006.01) , **G01N33/566**(2006.01)

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)

G01N33/545(2006.01) , **G01N33/566**(2006.01)

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	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

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 2004-271514 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 30 September, 2004 (30.09.04), & US 2005-0008851 A	1-23
Y	JP 2004-180569 A (Toray Industries, Inc.), 02 July, 2004 (02.07.04), (Family: none)	1-23
P,X	JP 2005-189222 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 04 July, 2005 (04.07.05), & US 2005-181497 A	1-23
P,X	JP 2005-283396 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 13 October, 2005 (13.10.05), (Family: none)	1-23

☐ 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
06 June, 2006 (06.06.06)

Date of mailing of the international search report
20 June, 2006 (20.06.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））
Int.Cl. G01N33/545(2006. 01), G01N33/566(2006. 01)

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（I P C））

Int.Cl. G01N33/545(2006. 01), G01N33/566(2006. 01)

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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 6 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	J P 2 0 0 4 - 2 7 1 5 1 4 A（富士写真フイルム株式会社） 2 0 0 4 . 0 9 . 3 0 & U S 2 0 0 5 - 0 0 0 8 8 5 1 A	1 - 2 3
Y	J P 2 0 0 4 - 1 8 0 5 6 9 A（東レ株式会社）2 0 0 4 . 0 7 . 0 2 (ファミリーなし)	1 - 2 3

☒ 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。

* 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
0 6 . 0 6 . 2 0 0 6

国際調査報告の発送日
2 0 . 0 6 . 2 0 0 6

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号1 0 0 - 8 9 1 5
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）	2 J	9 5 0 7
竹中 靖典		
電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線	3 2 5 2	

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 請求の範囲の番号
P X	J P 2 0 0 5 - 1 8 9 2 2 2 A (富士写真フイルム株式会社) 2 0 0 5 . 0 7 . 0 4 & U S 2 0 0 5 - 1 8 1 4 9 7 A	1 - 2 3
P X	J P 2 0 0 5 - 2 8 3 3 9 6 A (富士写真フイルム株式会社) 2 0 0 5 . 1 0 . 1 3 (ファミリーなし)	1 - 2 3