

(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  
2019年9月19日(19.09.2019)



(10) 国際公開番号

**WO 2019/177157 A1**

(51) 国際特許分類:

**G01N 33/53** (2006.01) **G01N 33/545** (2006.01)  
**G01N 33/543** (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/010920

(22) 国際出願日: 2019年3月15日(15.03.2019)

(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 2018-049276 2018年3月16日(16.03.2018) JP  
特願 2019-044833 2019年3月12日(12.03.2019) JP

(71) 出願人: 富士フイルム株式会社 (**FUJIFILM CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布2丁目2番30号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 大内 亮(**OUCHI Ryou**); 〒2588538 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 中村 和浩(**NAKAMURA Kazuhiro**); 〒2588538 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス(**SIKS & CO.**); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 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, 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, JO, JP, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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))

(54) **Title:** REAGENT KIT, MEASUREMENT KIT, AND MEASUREMENT METHOD

(54) 発明の名称: 試薬キット、測定キットおよび測定方法

(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of providing a reagent kit, measurement kit, and measurement method for immunologically measuring serum amyloid A with high accuracy and high sensitivity, without using an alcohol designated as a hazardous material in the fire protection code. The present invention provides a reagent kit that is for measuring serum amyloid A and that contains: first particles labelled and modified with a first binding substance capable of specifically binding to serum amyloid A; and at least one nonionic surfactant having a molecular weight of 1000 or less.

(57) 要約: 本発明の課題は、消防法上の危険物でもあるアルコールを使用することなく、血清アミロイドAを正確かつ高感度に免疫学的に測定するための試薬キット、測定キットおよび測定方法を提供することである。本発明によれば、血清アミロイドAと特異的な結合性を有する第一の結合物質により修飾され、かつ標識を有する第一の粒子と、少なくとも一種の分子量1000以下の非イオン性界面活性剤とを含む、血清アミロイドAの測定のための試薬キットが提供される。



**WO 2019/177157 A1**

## 明 細 書

発明の名称： 試薬キット、測定キットおよび測定方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、血清アミロイドAの測定のための試薬キット、血清アミロイドAのための測定キットおよび生体試料中の血清アミロイドAの測定方法に関する。

### 背景技術

[0002] 従来、バイオ測定等において、高感度かつ容易な測定法として蛍光検出法が広く用いられている。この蛍光検出法は、特定波長の光により励起されて蛍光を発する検出対象物質を含むと考えられる試料に上記特定波長の励起光を照射し、そのとき蛍光を検出することによって検出対象物質の存在を確認する方法である。また、検出対象物質が蛍光体ではない場合、蛍光色素で標識された検出対象物質と特異的に結合する物質を試料に接触させ、その後上記と同様にして蛍光を検出することにより、この結合すなわち検出対象物質の存在を確認することも広くなされている。

[0003] また、このような蛍光検出法において、感度を向上させるため、プラズモン共鳴による電場増強の効果を利用する方法が特許文献1などに提案されている。これは、プラズモン共鳴を生じさせるため、透明な支持体上の所定領域に金属層を設けたセンサチップを備え、支持体と金属膜との界面に対して支持体の金属層形成面と反対の面側から、全反射角以上の所定の角度で励起光を入射させ、この励起光の照射により金属層に表面プラズモンを生じさせ、その電場増強作用によって、蛍光を増強させることによりシグナル／ノイズ（S／N）を向上させるものである。

[0004] 血清アミロイドA（Serum Amyloid A：SAAとも表記する）は、分子量約11,600の非常に疎水性の高いタンパク質で、生体に感染、腫瘍および外傷等の種々のストレスが加わり、それに起因して炎症が生じた際に、血中における濃度が鋭敏に増加するという性質をもっている。

このため、しばしば炎症の程度を知るための炎症マーカーとして、血中のSAA濃度が免疫学的測定方法を用いて測定されている。

[0005] しかし、SAAは疎水性が高いためか、通常血中ではほとんどが高比重リポタンパク質（high-density lipoprotein: HDL）と会合していることが知られている。SAAの抗原決定基はリポタンパク質の内部の外界と接触していない部分に隠されており、そのままでは抗体と反応できないことがある。したがって、免疫学的な測定に際して、隠れた抗原決定基を露出させるための前処理が必要となることが多い。例えば、特許文献2では免疫学的測定法の一工程である希釈工程における希釈液の成分として親水性アルコールを加えることで、高感度かつ高精度でSAAを測定することを見出している。また、特許文献3には、高比重リポ蛋白質とSAAを含む血清を非変性条件下でゲルろ過により分画して得ることができる分子量10～40kDの分画に含まれるSAAに反応する抗体が記載されている。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0006] 特許文献1：特開2010-190880号公報

特許文献2：特開平8-178921号公報

特許文献3：特開平9-104699号公報

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0007] しかしながら、特許文献2に記載された、親水性アルコールを加えることでSAAを測定する場合には、揮発によりアルコール濃度が容易に変化し、SAAを正確に定量することができないという問題がある。また、特許文献3においては、特殊な抗体の精製方法が必要という問題がある。本発明は、消防法上の危険物でもあるアルコールを使用することなく、SAAを正確かつ高感度に免疫学的に測定するための試薬キット、測定キットおよび測定方

法を提供することを課題とする。

### 課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、血清アミロイドAと特異的な結合性を有する第一の結合物質により修飾され、かつ標識を有する第一の粒子と、少なくとも一種の分子量1000以下の非イオン性界面活性剤とを組み合わせる使用することにより、上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

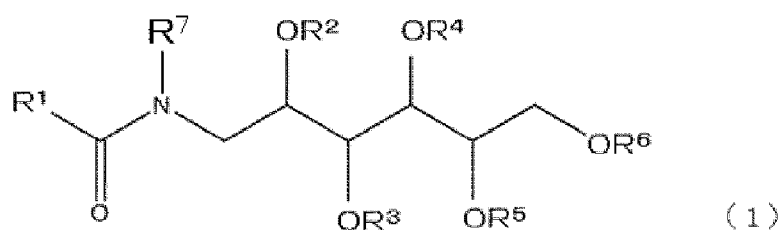
[0009] 即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

[1] 血清アミロイドAと特異的な結合性を有する第一の結合物質により修飾され、かつ標識を有する第一の粒子と、少なくとも一種の分子量1000以下の非イオン性界面活性剤とを含む、血清アミロイドAの測定のための試薬キット。

[2] 上記界面活性剤が、グルカミン骨格を有する化合物である、[1]に記載の試薬キット。

[3] 上記界面活性剤が、下記式(1)で表される化合物である、[1]または[2]に記載の試薬キット。

[化1]



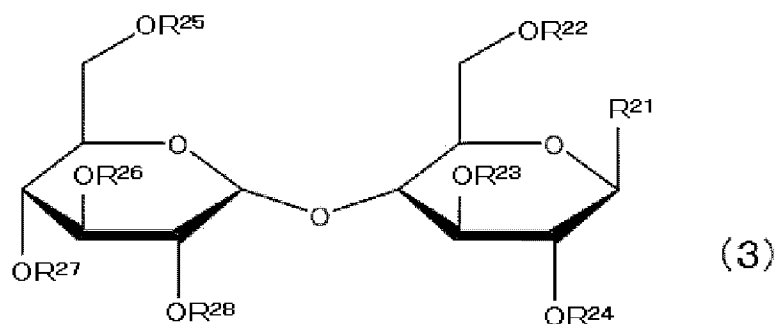
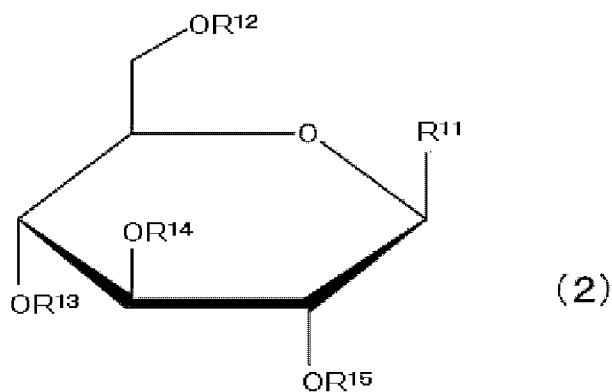
式中、R<sup>1</sup>は、置換されていてもよい炭化水素基を示し、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>はそれぞれ独立に、水素原子、または置換されていてもよい炭化水素基を示す。但し、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>のうち少なくとも3つは水素原子である。R<sup>7</sup>は、置換されていてもよい炭化水素基を示す。

[0010] [4] 上記界面活性剤が、疎水性基を有する単糖類または疎水性基を有する二糖類である、[1]に記載の試薬キット。

〔５〕 上記界面活性剤が、グルコース骨格またはマルトース骨格を有する化合物である、〔４〕に記載の試薬キット。

〔６〕 上記界面活性剤が、下記式（２）または下記式（３）で表される化合物である、〔１〕、〔４〕および〔５〕の何れかーに記載の試薬キット。

〔化２〕



式中、 $R^{11}$ は、置換されていてもよいアルコキシ基、置換されていてもよいアルケニルオキシ基、置換されていてもよいアルキニルオキシ基、置換されていてもよいアルキルチオ基、置換されていてもよいアルケニルチオ基、置換されていてもよいアルキニルチオ基を示し、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 、 $R^{14}$ および $R^{15}$ はそれぞれ独立に、水素原子、または置換されていてもよい炭化水素基を示す。但し、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 、 $R^{14}$ および $R^{15}$ のうち少なくとも3つは水素原子である。

式中、 $R^{21}$ は、置換されていてもよいアルコキシ基、置換されていてもよいアルケニルオキシ基、置換されていてもよいアルキニルオキシ基、置換され

ていてもよいアルキルチオ基、置換されていてもよいアルケニルチオ基、置換されていてもよいアルキニルチオ基を示し、 $R^{22}$ 、 $R^{23}$ 、 $R^{24}$ 、 $R^{25}$ 、 $R^{26}$ 、 $R^{27}$ および $R^{28}$ はそれぞれ独立に、水素原子、または置換されていてもよい炭化水素基を示す。但し、 $R^{22}$ 、 $R^{23}$ 、 $R^{24}$ 、 $R^{25}$ 、 $R^{26}$ 、 $R^{27}$ および $R^{28}$ のうち少なくとも3つは水素原子である。

[0011] [7] 上記第一の粒子が、ラテックス粒子である、[1] から [6] のいずれかに記載の試薬キット。

[8] 上記第一の粒子の平均粒径が70 nm以上500 nm以下である、[1] から [7] のいずれかに記載の試薬キット。

[9] 上記標識が蛍光色素を含む、[1] から [8] のいずれかに記載の試薬キット。

[10] 上記第一の結合物質が抗体である、[1] から [9] のいずれかに記載の試薬キット。

[11] 血清アミロイドAと特異的な結合性を有しない第二の結合物質により修飾され、かつ標識を有しない第二の粒子をさらに含む、[1] から [10] のいずれかに記載の試薬キット。

[0012] [12] [1] から [11] のいずれかに記載の試薬キットと、血清アミロイドAまたは上記第一の結合物質と特異的な結合性を有する第三の結合物質が固定されている第一の金属膜が形成された基板とを含む、血清アミロイドAのための測定キット。

[13] 上記基板に、血清アミロイドAと結合性を有さず、上記第一の結合物質と特異的な結合性を有する第四の結合物質が固定された第二の金属膜がさらに形成されている、[12] に記載の測定キット。

[0013] [14] 血清アミロイドAを含む生体試料と、血清アミロイドAと特異的な結合性を有する第一の結合物質により修飾され、かつ標識を有する第一の粒子と、少なくとも一種の分子量1000以下の非イオン性界面活性剤とを含む混合液を調製する工程；

血清アミロイドAと特異的な結合性を有する第三の結合物質が固定されてい

る第一の金属膜が形成された基板の一端の注入口に、上記混合液を添加する工程；

上記混合液を上記基板上に流下させる工程；および、

上記第一の金属膜上の標識の情報を取得する工程、

を含む、生体試料中の血清アミロイドAの測定方法。

〔15〕 上記混合液中の上記界面活性剤の濃度が0.01質量%以上10質量%以下である、〔14〕に記載の血清アミロイドAの測定方法。

〔16〕 上記混合液を調製する工程が、上記生体試料に対して5倍以上希釈された混合液を調製する工程である、〔14〕または〔15〕に記載の血清アミロイドAの測定方法。

### 発明の効果

〔0014〕 本発明による試薬キット、測定キットおよび測定方法によれば、SAAを正確かつ高感度に免疫学的に測定することができる。

### 図面の簡単な説明

〔0015〕 〔図1〕図1は、センサチップの概略図を示す。

〔図2〕図2は、センサチップの分解図を示す。

### 発明を実施するための形態

〔0016〕 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本明細書において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値および最大値として含む範囲を意味する。

〔0017〕 〔試薬キット〕

本発明の試薬キットは、血清アミロイドAと特異的な結合性を有する第一の結合物質により修飾され、かつ標識を有する第一の粒子と、少なくとも一種の分子量1000以下の非イオン性界面活性剤とを含む、血清アミロイドAの測定のための試薬キットである。

本発明の試薬キットは、上記の通り、第一の粒子と、非イオン性界面活性剤とを含むが、第一の粒子と非イオン性界面活性剤とは混合物としてキットに含まれていてもよいし、別々にキットに含まれていてもよい。

[0018] (血清アミロイドA)

本発明における被検物質は、血清アミロイドA (SAA) である。SAAは炎症マーカーとして有用である。血清アミロイドAとしては、例えば、ネコ血清またはネコ血漿中の血清アミロイドAを挙げることができる。

[0019] (界面活性剤)

血清中ではSAAの大部分が高比重リポ蛋白質 (HDL) と会合した状態で存在していることが知られている。そのため、血清アミロイドAと結合性を有する第一の結合物質および第三の結合物質に対する血清アミロイドAの認識部位がHDLに遮蔽されており、第一の結合物質および第三の結合物質が血清アミロイドAに結合できないという問題がある。本発明は、このような現象を解決するために、界面活性剤を用いて血清アミロイドAをHDLから解離させることにより、正確に血清中のSAAを定量することが可能になる。

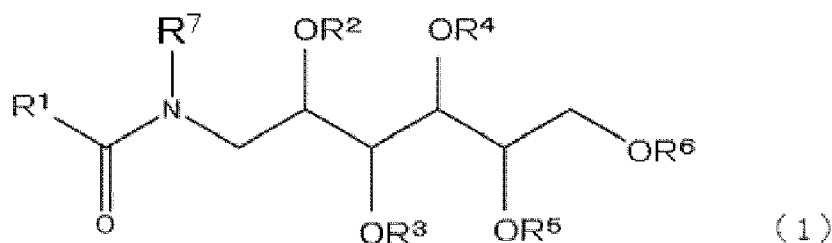
[0020] 本発明において使用する界面活性剤は、分子量1000以下の非イオン性界面活性剤である。非イオン性界面活性剤の分子量が1000を超えると、HDLと同じように検体として認識される部位を遮蔽してしまう場合があり、正確にSAAの測定ができなくなる場合があることから、分子量が1000以下の非イオン性界面活性剤を使用する。界面活性剤の分子量の下限は、好ましくは200以上であり、より好ましくは300以上である。界面活性剤の分子量の上限は、好ましくは900以下であり、より好ましくは800以下であり、さらに好ましくは700以下であり、特に好ましくは600以下である。

[0021] 本発明においては、結合物質の結合性に比較的影響を及ぼさない非イオン性界面活性剤を用いる。イオン性界面活性剤の場合には、生体試料中の電荷を有する基と相互作用することにより測定に影響を及ぼす場合があり、SAAを正確に測定することが難しくなることから、本発明においては非イオン性界面活性剤を用いる。非イオン性界面活性剤は、別の呼称として、ノニオン性界面活性剤と表記される場合がある。陰イオン系の界面活性剤はアニオ

ン性界面活性剤、陽イオン系の界面活性剤はカチオン性界面活性剤、両性イオン系の界面活性剤はベタインと記載されることがある。本発明では、ノニオン性、即ち、非イオン性界面活性剤が用いられる。具体的な非イオン性界面活性剤としては、エステル型、エーテル型、エステルエーテル型またはアルカノールアミド型から選ばれる界面活性剤が好ましく、エーテル型またはアルカノールアミド型がより好ましい。

[0022] 界面活性剤としては、グルカミン骨格を有する化合物、特にグルカミン骨格を有するアルカノールアミド型の界面活性剤が更に好ましい。グルカミン骨格を有するアルカノールアミド型の非イオン性界面活性剤の好ましい例としては、下記式（１）で表される化合物を挙げることができる。

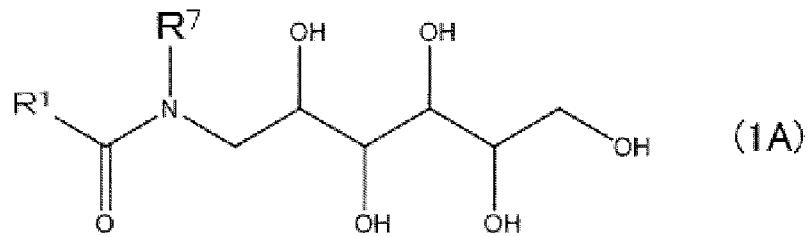
[化3]



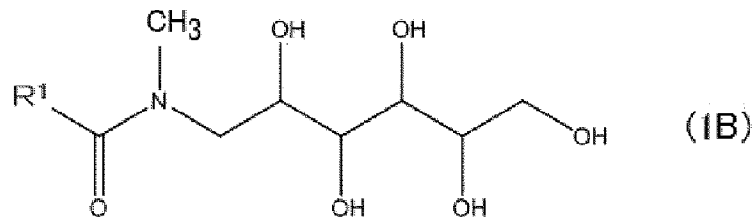
式中、 $\text{R}^1$ は、置換されていてもよい炭化水素基を示し、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$ および $\text{R}^6$ はそれぞれ独立に、水素原子、または置換されていてもよい炭化水素基を示す。但し、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$ および $\text{R}^6$ のうち少なくとも3つは水素原子である。 $\text{R}^7$ は、置換されていてもよい炭化水素基を示す。

[0023] 式（１）で表される化合物のさらに好ましい例としては、さらに下記式（１Ａ）または下記式（１Ｂ）で表される化合物を挙げることができる。

[化4]



[化5]



[0024] 式中、 $R^1$ および $R^7$ は、式(1)における定義と同義である。

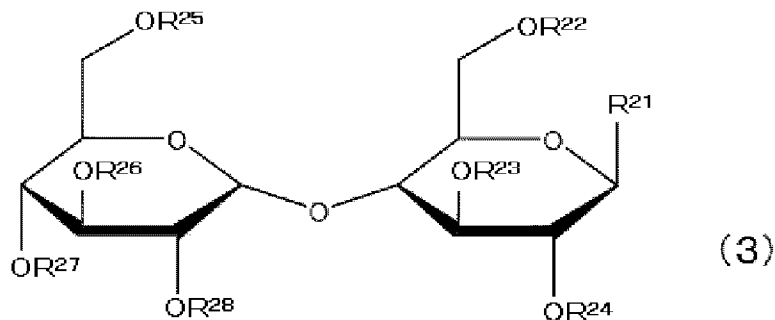
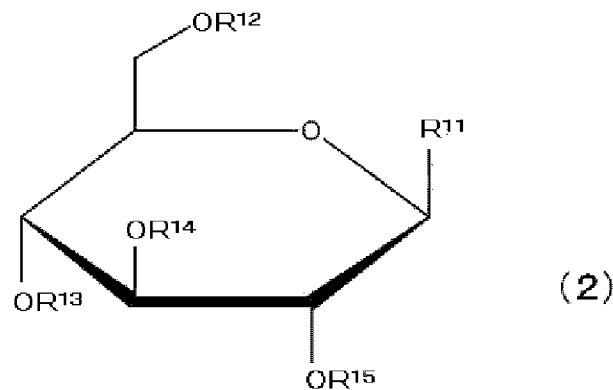
[0025] 式(1)、式(1A)または式(1B)で表される化合物としては、以下の界面活性剤を使用することが好ましい。

n-オクタノイル-N-メチル-D-グルカミン (同仁化学社製MEGA-8)

n-ノナノイル-N-メチル-D-グルカミン (同仁化学社製MEGA-9)

[0026] 界面活性剤としては、疎水性基を有する単糖類または疎水性基を有する二糖類も好ましい。疎水性基を有する単糖類または疎水性基を有する二糖類としては、より好ましくは、グルコース骨格またはマルトース骨格を有する化合物である。グルコース骨格またはマルトース骨格を有する化合物としては、下記式(2)または下記式(3)で表される化合物を挙げることができる。

[化6]



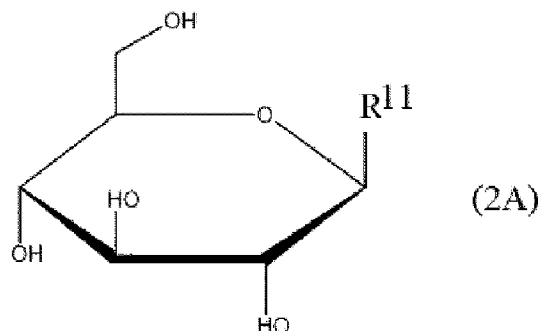
式中、 $R^{11}$ は、置換されていてもよいアルコキシ基、置換されていてもよいアルケニルオキシ基、置換されていてもよいアルキニルオキシ基、置換されていてもよいアルキルチオ基、置換されていてもよいアルケニルチオ基、置換されていてもよいアルキニルチオ基を示し、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 、 $R^{14}$ および $R^{15}$ はそれぞれ独立に、水素原子、または置換されていてもよい炭化水素基を示す。但し、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 、 $R^{14}$ および $R^{15}$ のうち少なくとも3つは水素原子である。

式中、 $R^{21}$ は、置換されていてもよいアルコキシ基、置換されていてもよいアルケニルオキシ基、置換されていてもよいアルキニルオキシ基、置換されていてもよいアルキルチオ基、置換されていてもよいアルケニルチオ基、置換されていてもよいアルキニルチオ基を示し、 $R^{22}$ 、 $R^{23}$ 、 $R^{24}$ 、 $R^{25}$ 、 $R^{26}$ 、 $R^{27}$ および $R^{28}$ はそれぞれ独立に、水素原子、または置換されていてもよい炭化水素基を示す。但し、 $R^{22}$ 、 $R^{23}$ 、 $R^{24}$ 、 $R^{25}$ 、 $R^{26}$ 、 $R^{27}$ およ

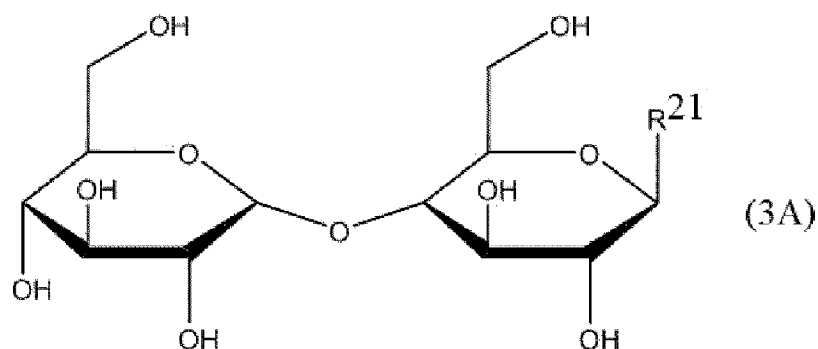
び $R^{28}$ のうち少なくとも3つは水素原子である。

[0027] 式(2)または式(3)で表される化合物のさらに好ましい例としては、さらに下記式(2A)または下記式(3A)で表される化合物を挙げることができる。

[化7]



[0028] [化8]



式中、 $R^{11}$ および $R^{21}$ は、式(2)および式(3)における定義と同義である。

[0029] 式(2A)で表される化合物としては、以下の界面活性剤を使用することが好ましい。 $n$ -オクチル- $\beta$ -D-グルコシド(同仁化学社製O001)。式(2A)における $R^{11}$ がオクチルオキシ基である化合物。

[0030] 式(3A)で表される化合物としては、以下の界面活性剤を使用することが好ましい。 $n$ -ドデシル- $\beta$ -D-マルトシド(同仁化学社製D316)  
 $n$ -デシル- $\beta$ -D-マルトシド(同仁化学社製D382)

[0031] 炭化水素基、アルコキシ基、アルケニルオキシ基、アルキニルオキシ基、アルキルチオ基、アルケニルチオ基およびアルキニルチオ基はそれぞれ置換されていてもよいが、置換基としては、下記の置換基群Aに記載の置換基が挙げられる。置換基群Aの置換基は、置換基群Aの置換基によりさらに置換されていてもよい。

置換基群A：

スルファモイル基、シアノ基、イソシアノ基、チオシアナト基、イソチオシアナト基、ニトロ基、ニトロシル基、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、アミノ基、メルカプト基、アミド基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、カルバモイル基、アシル基、アルデヒド基、カルボニル基、アリール基、アルキル基、ハロゲン原子で置換されたアルキル基、エテニル基、エチニル基、シリル基、およびトリアルキルシリル基（トリメチルシリル基等）。

[0032] 炭化水素基としては、アルキル基、アルケニル基またはアルキニル基を挙げることができる。炭化水素基の炭素数は特に限定されないが、一般的には1～20であり、好ましくは1～16であり、より好ましくは1～12である。

アルコキシ基、アルケニルオキシ基、アルキニルオキシ基、アルキルチオ基、アルケニルチオ基およびアルキニルチオ基の炭素数は特に限定されないが、一般的には1～20であり、好ましくは1～16であり、より好ましくは1～12である。

[0033] （第一の結合物質）

本発明で用いる第一の結合物質は、血清アミロイドAと特異的な結合性を有する物質である。第一の結合物質としては、抗体を使用できるが、これに限定されるものではない。好ましくは、第一の結合物質は抗体である。第一の結合物質が抗体である場合は、血清アミロイドAと特異的な結合性を有する抗体として、例えば、血清アミロイドAによって免疫された動物の血清から調製する抗血清や、抗血清から精製された免疫グロブリン画分、血清アミ

ロイドAによって免疫された動物の脾臓細胞を用いる細胞融合によって得られるモノクローナル抗体、あるいは、それらの断片〔例えば、F (a b')<sub>2</sub>、F a b、F a b'、またはF v〕などを用いることができる。これらの抗体の調製は、常法により行なうことができる。さらに、その抗体がキメラ抗体などの場合のように、修飾を加えられたものでもよいし、また市販の抗体でも、動物血清や培養上清から公知の方法により調製した抗体でも使用可能である。

[0034] 抗体は、その動物種やサブクラス等によらず使用できる。例えば、本発明に用いることが可能な抗体は、マウス、ラット、ハムスター、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ウシ、ニワトリなど免疫反応が起こり得る生物に由来する抗体、具体的には、マウス I g G、マウス I g M、ラット I g G、ラット I g M、ハムスター I g G、ハムスター I g M、ウサギ I g G、ウサギ I g M、ヤギ I g G、ヤギ I g M、ヒツジ I g G、ヒツジ I g M、ウシ I g G、ウシ I g M、トリ I g Y 等であり、ポリクローナルもしくはモノクローナルのどちらも使用可能である。

[0035] 特に、静電相互作用により血清アミロイドAと特異的な結合性を有する第一の結合物質としては、抗血清アミロイドA抗体が好ましく用いられる。本発明ではサンドイッチ方式を選択することが好ましく、この場合には、ペアとなる抗体を基板に被覆する必要があるが、基板および第一の粒子上の両方に、これらの抗S A Aモノクローナル抗体を用いることが可能である。

[0036] (第一の粒子)

本発明で用いる第一の粒子は、上記した第一の結合物質により修飾され、かつ標識を有する粒子である。

第一の粒子は、乾燥粒子であることが好ましいが、特に限定はされない。第一の粒子としては、免疫測定に通常用いられ得る粒子として、例えば、ポリスチレンビーズなどの高分子粒子、ガラスビーズ等のガラス粒子を用いることができる。第一の粒子の材質の具体例としては、スチレン、メタクリル酸、グリシジル(メタ)アクリレート、ブタジエン、塩化ビニル、酢酸ビニ

ルアクリレート、メチルメタクリレート、エチルメタクリレート、フェニルメタクリレート、ブチルメタクリレートなどのモノマーを用いた高分子、または2つ以上のモノマーを用いた共重合体などの合成高分子があり、これらを均一に懸濁させたラテックスが好ましい。また、その他の有機高分子粉末や無機物質粉末、微生物、血球や細胞膜片、リポソームなどが挙げられる。

[0037] ラテックス粒子を使用する場合、ラテックスの材質の具体例としては、ポリスチレン、スチレンーアクリル酸共重合体、スチレンーメタクリル酸共重合体、スチレンーグリシジル（メタ）アクリレート共重合体、スチレンースチレンスルホン酸塩共重合体、メタクリル酸重合体、アクリル酸重合体、アクリロニトリルーブタジエンスチレン共重合体、塩化ビニルーアクリル酸エステル共重合体、ポリ酢酸ビニルアクリレートなどが挙げられる。ラテックスとしては、単量体としてスチレンを少なくとも含む共重合体が好ましく、スチレンと、アクリル酸またはメタクリル酸との共重合体が特に好ましい。ラテックスの作製方法は特に限定されず、任意の重合方法により作製することができる。但し、抗体標識の際に界面活性剤が存在すると抗体固定化が困難となるため、ラテックスの作製には、無乳化剤乳化重合、即ち界面活性剤などの乳化剤を用いない乳化重合が好ましい。

[0038] 第一の粒子は標識を有する。標識は、蛍光を発することが好ましい。重合により得られたラテックス自体が蛍光性である場合には、そのまま蛍光ラテックス粒子として使用することができる。重合により得られたラテックスが非蛍光性の場合には、ラテックスに蛍光物質（蛍光色素など）を添加することによって、蛍光ラテックス粒子を作製することができる。即ち、蛍光ラテックス粒子は、水および水溶性有機溶剤を含むラテックス粒子の溶液に蛍光色素を添加して攪拌することなどにより、蛍光色素をラテックス粒子の内部に含浸させることにより製造することが可能である。

[0039] 標識を有する第一の粒子としては、蛍光色素を含有したリポゾームやマイクロカプセル等を蛍光粒子として使用することもできる。蛍光発色は、紫外光等を吸収して励起し、基底状態に戻る際に放出されるものであれば特に制

限されるものではなく、例えば、黄緑（励起波長505 nm／放出波長515 nm、以下同じ）、青（350～356 nm／415～440 nm）、赤（535～580 nm／575～605 nm）、オレンジ（540 nm／560 nm）、レッド・オレンジ（565 nm／580 nm）、クリムゾン（625 nm／645 nm）、ダークレッド（660 nm／680 nm）などの蛍光発色が用いられ得る。これらの蛍光を発する蛍光粒子は、例えば、Invitrogen社から入手可能であり、同社においてFluoSpheres（登録商標）の商品名で市販されている。

[0040] 標識を有する第一の粒子の粒径は、平均粒径として定義される。第一の粒子の平均粒径は、特に限定されず、好ましい範囲は、粒子の材質や血清アミロイドAを定量する濃度範囲、測定機器などによって異なるが、70 nm以上500 nm以下であることが好ましく、70 nm以上300 nm以下であることがより好ましく、80 nm以上250 nm以下であることがさらに好ましく、90 nm以上200 nm以下であることが特に好ましい。

[0041] 本発明に用いられる粒子の平均粒径は、市販の粒度分布計等で計測することが可能である。粒度分布の測定法としては、光学顕微鏡法、共焦点レーザー顕微鏡法、電子顕微鏡法、原子間力顕微鏡法、静的光散乱法、レーザー回折法、動的光散乱法、遠心沈降法、電気パルス計測法、クロマトグラフィー法、超音波減衰法等が知られており、それぞれの原理に対応した装置が市販されているが、これらの測定法の中で、動的光散乱法で計測することが好ましく、本発明では、平均粒径は、25℃にて、粘度0.8872 CP（0.8872 mPa・s）、水の屈折率1.330の条件で測定したメジアン径（50%径、d50）として求めるものとする。

[0042] 本発明で用いる第一の粒子は、上記した第一の結合物質により修飾されている。標識を有する第一の粒子に、第一の結合物質を結合するための方法は特に限定されない。例えば、特開2000-206115号公報やモレキュラープローブ社FluoSpheres（登録商標）ポリスチレンマイクロスフィアF8813に添付のプロトコールなどに記載されており、免疫凝集

反応試薬を調製する公知の方法がいずれも使用可能である。また、抗体などの結合物質を粒子に固定化する方法としては、物理吸着を用いた方法、および共有結合による化学結合を用いた方法、のいずれの方法も採用可能である。抗体などの結合物質を粒子に固定させた後に結合物質が被覆されていない粒子表面を覆うブロッキング剤として、公知の物質、例えば、BSA（ウシ血清アルブミン）やスキムミルク、カゼイン、大豆由来成分、魚由来成分、ポリエチレングリコールなどや、これらの物質やこれらと性質が同じである物質を含む市販の免疫反応ブロッキング剤などが使用可能である。これらのブロッキング剤は、必要に応じて熱や酸・アルカリ等により部分変性などの前処理を施すことも可能である。

[0043] （第二の結合物質）

本発明の試薬キットはさらに、血清アミロイドAと特異的な結合性を有しない第二の結合物質により修飾され、かつ標識を有しない第二の粒子を含んでいてもよい。

血清アミロイドAを含む陽性となる被検試料だけでなく、血清アミロイドAを含まない陰性の被検試料に対しても反応して陽性となる被検試料が存在しており、擬陽性の解決が課題として認識されている。このような擬陽性を示す原因は明確にはなっていないが、血清中に含まれる何らかの因子が存在して非特異反応を起こすことが原因の一つではないかと考えられている。本発明では、血清アミロイドAと特異的な結合性を有しない第二の結合物質により修飾され、かつ標識を有しない第二の粒子を併用することで、このような問題を解決することが好ましい。

[0044] 第二の結合物質としては、血清アミロイドAと特異的な結合性を有さない物質を使用することができ、上記したような擬陽性を示す原因物質に結合する可能性のある物質を使用することが好ましく、さらに第一の結合物質に対して親和性を有しない化合物を使用することが好ましい。第二の結合物質としては、抗体、あるいは抗体に対して結合するタンパク質（Protein A、Protein G）などを使用することができ、抗体が好ましい。例えば、第二の結合物

質が抗体である場合には、その抗原によって免疫された動物の血清から調製する抗血清、抗血清から精製された免疫グロブリン画分、血清アミロイドAによって免疫された動物の脾臓細胞を用いる細胞融合によって得られるモノクローナル抗体、あるいは、それらの断片〔例えば、F (a b')<sub>2</sub>、F a b、F a b'、またはF v〕などを用いることが可能である。これらの抗体の調製は、常法により行なうことができる。さらに、その抗体がキメラ抗体などの場合のように、修飾を加えられたものでもよいし、また市販の抗体でも、動物血清や培養上清から公知の方法により調製した抗体も使用可能である。本発明では、第二の結合物質として、特に抗CRP抗体を使用する態様が好ましい。

[0045] (第二の粒子)

第二の粒子は、標識を有しない。また第二の粒子は乾燥粒子であることが好ましいが、特に限定されない。

第二の粒子としては、免疫測定に通常用いられ得る粒子として、例えば、ポリスチレンビーズなどの高分子粒子、ガラスビーズ等のガラス粒子を用いることができる。第二の粒子の材質の具体例としては、スチレン、メタクリル酸、グリシジル(メタ)アクリレート、ブタジエン、塩化ビニル、酢酸ビニルアクリレート、メチルメタクリレート、エチルメタクリレート、フェニルメタクリレート、ブチルメタクリレートなどのモノマーを用いた高分子、または2つ以上のモノマーを用いた共重合体などの合成高分子があり、これらを均一に懸濁させたラテックスが好ましい。また、その他の有機高分子粉末や無機物質粉末、微生物、血球や細胞膜片、リポソームなどが挙げられる。

[0046] ラテックス粒子を使用する場合、ラテックスの材質の具体例としては、ポリスチレン、スチレンーアクリル酸共重合体、スチレンーメタクリル酸共重合体、スチレンーグリシジル(メタ)アクリレート共重合体、スチレンースチレンスルホン酸塩共重合体、メタクリル酸重合体、アクリル酸重合体、アクリロニトリルーブタジエンスチレン共重合体、塩化ビニルーアクリル酸

エステル共重合体、ポリ酢酸ビニルアクリレートなどが挙げられる。ラテックスとしては、単量体としてスチレンを少なくとも含む共重合体が好ましく、スチレンと、アクリル酸またはメタクリル酸との共重合体が特に好ましい。ラテックスの作製方法は特に限定されず、任意の重合方法により作製することができる。但し、抗体標識の際に界面活性剤が存在すると抗体固定化が困難となるため、ラテックスの作製には、無乳化剤乳化重合、即ち界面活性剤などの乳化剤を用いない乳化重合が好ましい。

[0047] 第二の結合物質で結合された第二の粒子の粒径は、平均粒径として定義される。第二の粒子の平均粒径は、粒子の材質や血清アミロイドAを定量する濃度範囲、測定機器などによって異なるが、70nm以上500nm以下であることが好ましく、100nm以上200nm以下であることがより好ましく、120nm以上180nm以下であることがさらに好ましく、130nm以上170nm以下であることが特に好ましい。

第一の粒子と第二の粒子の使用比率については、第一の粒子に対する第二の粒子の質量比が1～10であることが好ましく、1～6であることがより好ましく、2～6であることが更に好ましい。

[0048] [測定キット]

本発明の測定キットは、上記した本発明の試薬キットと、血清アミロイドAまたは上記第一の結合物質と特異的な結合性を有する第三の結合物質（即ち、血清アミロイドAと特異的な結合性を有する第三の結合物質、または上記第一の結合物質と特異的な結合性を有する第三の結合物質）が固定されている第一の金属膜が形成された基板とを含む。上記基板には、血清アミロイドAと結合性を有さず、第一の結合物質と特異的な結合性を有する第四の結合物質が固定された第二の金属膜がさらに形成されていてもよい。

[0049] (第三の結合物質)

第三の結合物質は、血清アミロイドAまたは第一の結合物質と特異的な結合性を有する物質である限り特に限定されないが、好ましい例としては、抗原、抗体、またはこれらの複合体が挙げられ、抗体を用いることが好ましい。

。第三の結合物質が抗体である場合は、血清アミロイドAに対して特異性を有する抗体として、例えば、血清アミロイドAによって免疫された動物の血清から調製する抗血清、抗血清から精製された免疫グロブリン画分、血清アミロイドAによって免疫された動物の脾臓細胞を用いる細胞融合によって得られるモノクローナル抗体、あるいは、それらの断片〔例えば、F (a b' ) 2、F a b、F a b'、またはF v〕などを用いることができる。これらの抗体の調製は、常法により行なうことができる。さらに、その抗体がキメラ抗体などの場合のように、修飾を加えられたものでもよいし、また市販の抗体でも、動物血清や培養上清から公知の方法により調製した抗体でも使用可能である。

[0050] 抗体は、その動物種やサブクラス等によらず使用できる。例えば、本発明に用いることが可能な抗体は、マウス、ラット、ハムスター、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ウシ、ニワトリなど免疫反応が起こり得る生物に由来する抗体、具体的には、マウス I g G、マウス I g M、ラット I g G、ラット I g M、ハムスター I g G、ハムスター I g M、ウサギ I g G、ウサギ I g M、ヤギ I g G、ヤギ I g M、ヒツジ I g G、ヒツジ I g M、ウシ I g G、ウシ I g M、トリ I g Y 等であり、ポリクローナルもしくはモノクローナルのどちらも使用可能である。断片化抗体は、少なくとも1つの抗原結合部位を持つ、完全型抗体から導かれた分子であり、具体的にはF a b、F (a b' ) 2等である。これらの断片化抗体は、酵素あるいは化学的処理によって、もしくは遺伝子工学的手法を用いて得られる分子である。

[0051] 第一の結合物質と特異的な結合性を有する第三の結合物質としては、特に限定されないが、好ましい例としては、抗原、抗体、またはこれらの複合体が挙げられる。抗体の調製方法および抗体の種類は、上記した内容と同様である。

[0052] (第四の結合物質)

第四の結合物質は、血清アミロイドAと結合性を有さず、第一の結合物質と特異的な結合性を有する物質である。第四の結合物質としては、例えば、

第一の結合物質（抗体）に対する抗体、結合物質（抗体）に対して結合するタンパク質（Protein A、Protein G）など、第一の結合物質に対して親和性を持つ化合物を使用することが好ましく、中でも更に好ましくは、抗体を使用することができる。抗体の調製方法および抗体の種類は、第三の結合物質について記載した内容と同様である。また、標識を有する第一の粒子に結合した第一の結合物質の一部が、第四の結合物質とリガンド－非リガンドの関係となる化合物を好ましく用いることができる。

[0053] （結合物質を基板に固定化する方法）

抗体などの第三の結合物質および第四の結合物質を基板に固定化する方法は、例えば、Nunc社の提供するTech Notes Vol. 2-12などに記載されており、一般的なELISA（酵素結合免疫吸着法）試薬を調製する公知の方法がいずれも使用可能である。また、基板上に自己組織化単分子膜（SAM）などを配することによる表面修飾を施しても良く、結合物質としての抗体を基板に固定化する方法としては、物理吸着を用いた方法、および共有結合による化学結合を用いた方法のいずれの方法も採用可能である。抗体を基板に固定させた後に抗体が被覆されていない基板表面を覆うブロッキング剤として、公知の物質、例えば、BSA（ウシ血清アルブミン）やスキムミルク、カゼイン、大豆由来成分、魚由来成分、ポリエチレングリコールなどや、これらの物質やこれらと性質が同じである物質を含む市販の免疫反应用ブロッキング剤などが使用可能である。これらのブロッキング剤は、必要に応じて熱や酸・アルカリ等により部分変性などの前処理を施すことも可能である。

[0054] （基板）

本発明で用いる基板は、金属膜が形成された基板であり、その形態は特に限定されないが、後述する表面プラズモン励起による蛍光検出法（SPF法）を行う場合には、後述する流路、および表面に反応部位である金属膜を有する基板を使用することが好ましい。金属膜を構成する金属としては、表面プラズモン共鳴が生じ得るような物質を用いることができる。好ましくは金

、銀、銅、アルミニウム、白金等の金属が挙げられ、特に金が好ましい。上記の金属は単独または組み合わせて使用することも可能である。また、上記基板への付着性を考慮して、基板と金属からなる層との間にクロム等からなる介在層を設けてもよい。金属膜の膜厚は特に制限はないが、例えば、0.1 nm以上500 nm以下であるものが好ましく、更には、1 nm以上200 nm以下であるものが好ましく、特に1 nm以上100 nm以下であるものが好ましい。500 nmを超えると、媒質の表面プラズモン現象を十分検出することができない。また、クロム等からなる介在層を設ける場合、その介在層の厚さは、0.1 nm以上、10 nm以下であるのが好ましい。

[0055] 金属膜の形成は常法によって行えばよく、例えば、スパッタリング法、マグネトロンスパッタリング法、蒸着法、イオンプレーティング法、電気めっき法、無電解めっき法等によって行うことができるが、基板への金属膜の良好な付着性を実現するために、スパッタリング法により金属膜を形成することが好ましい。

[0056] 金属膜は、好ましくは基板上に配置されている。ここで、「基板上に配置されている」とは、金属膜が基板上に直接接触するように配置されている場合のほか、金属膜が基板に直接接触することなく、他の層を介して配置されている場合をも含む。本発明で 사용할 ことができる基板としては例えば、一般的な光学ガラスの一種であるBK7（ホウ珪酸ガラス）等の光学ガラス、あるいは合成樹脂、具体的にはポリメチルメタクリレート、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、シクロオレフィンポリマーなどのレーザー光に対して透明な材料からなるものが使用できる。このような基板は、好ましくは、偏光に対して異方性を示さずかつ加工性の優れた材料が望ましい。SPF法による蛍光検出のための基板の一例としては、ポリメチルメタクリレート上に、金膜をスパッタリング法で作製した基板などを挙げることができる。

[0057] [血清アミロイドAの測定方法]

本発明による生体試料中の血清アミロイドAの測定方法は、

血清アミロイドAを含む生体試料と、血清アミロイドAと特異的な結合性を有する第一の結合物質により修飾され、かつ標識を有する第一の粒子と、少なくとも一種の分子量1000以下の非イオン性界面活性剤とを含む混合液を調製する工程；

血清アミロイドAと特異的な結合性を有する第三の結合物質が固定されている第一の金属膜が形成された基板の一端の注入口に、上記混合液を添加する工程；

上記混合液を上記基板上に流下させる工程；および、  
上記第一の金属膜上の標識の情報を取得する工程、  
を含む。

[0058] 生体試料としては、被検物質である血清アミロイドAを含む可能性のある試料である限り、特に限定されるものではなく、例えば、生物学的試料、特に動物（特に、ネコ、イヌ、またはヒト）の体液（例えば、血液、血清、血漿、髄液、涙液、汗、尿、膿、鼻水、または喀痰）若しくは排泄物（例えば、糞便）、臓器、組織、粘膜や皮膚などを挙げることができる。

[0059] 非イオン性界面活性剤は、SAAを含む生体試料の前処理に使用される。前処理液としては、事前に界面活性剤を含む液を準備し、検体液に混合して使用する使用方法や、生体試料液そのものに、乾燥した固形分の界面活性剤を添加して、検体液に溶かしこむ使用方法が用いられる。この場合、生体試料液と界面活性剤を混合した混合液中の界面活性剤の濃度としては、0.01質量%以上10質量%以下が好ましく、0.05質量%以上5質量%以下がより好ましく、0.1質量%以上3質量%以下が更に好ましく、0.1質量%以上2質量%以下が特に好ましい。濃度が、0.01質量%以上であると有効にSAAをHDLから分離することが可能となり、濃度が10質量%以下であると、界面活性剤の影響を受けにくい状態で、標識を有する第一の粒子上の第一の結合物質や、あるいは基板上の第一の金属膜上に固定された第三の結合物質と、SAAとが反応することが可能となる。

[0060] 上記混合液は、血清アミロイドAと特異的な結合性を有しない第二の結合

物質により修飾された第二の粒子をさらに含んでもよい。

また本発明による血清アミロイドAの測定方法は、上記混合液を、血清アミロイドAと結合性を有さず、上記第一の結合物質に対して結合性を有する第四の結合物質が固定された第二の金属膜に接触させる工程と、上記第二の金属膜から上記標識に応じたシグナルを検出する工程と、上記第二の金属膜から検出したシグナルを用いて上記第一の金属膜から検出したシグナルを補正する工程とをさらに含んでもよい。

[0061] 上記生体試料と界面活性剤の混合液は、生体試料を希釈した状態の混合液を使用することができる。希釈に用いる液としては、本発明の効果を発現する限り特に制限はないが、生体試料の組成に近い生理食塩水を用いることが好ましい。生理食塩水で希釈する生体試料に対する倍率はいずれの倍率での希釈が可能であるが、本発明の課題であるS A Aを正確かつ高感度に免疫学的に測定するための試薬キット、測定キットおよび測定方法を提供するためには、5倍以上に希釈した状態で血清アミロイドAの測定をすることが好ましい。生体試料の希釈によりS A Aを正確かつ高感度に測定することが可能となるが、生体試料を希釈する倍率が非常に高くなると、血清アミロイドA濃度に対するシグナルそのものが低下するため、希釈倍率は200倍以下に抑えることが好ましい。

[0062] (測定方法)

本発明の測定方法は、血清アミロイドAの存在の有無の検出や血清アミロイドAの量の測定（すなわち、定量）などを含む、最も広い概念として解釈される。本発明の測定方法の具体的な実施態様としてはサンドイッチ法または競合法が挙げられ、サンドイッチ法が好ましい。

[0063] <サンドイッチ法>

サンドイッチ法では、特に限定されるものではないが、例えば、以下の手順により血清アミロイドAを測定することができる。まず、血清アミロイドAと特異的な結合性を有する第一の結合物質、および血清アミロイドAと特異的な結合性を有する第三の結合物質を予め用意しておく。第一の結合物質

を、標識を有する第一の粒子に結合させて、血清アミロイドAと特異的な結合性を有する第一の結合物質で修飾された第一の粒子を作製する。次いで第三の結合物質を用意し、基板上に固定して反応部位（テストエリア）とする。また、第四の結合物質を用意し、基板上に固定してコントロールエリアとする。別途、血清アミロイドAと特異的な結合性を有しない第二の結合物質を用意し、標識を有さない第二の粒子に結合させて、血清アミロイドAと特異的な結合性を有しない第二の結合物質で修飾された標識を有しない第二の粒子を作製する。上記の第一の粒子と、第二の粒子を混合して容器に収納し、乾燥させる。血清アミロイドAを含む可能性のある被検試料（またはその抽出液）と、第一の粒子と第二の粒子の混合物と、界面活性剤とを混合し、この混合した液を基板に適用し、基板上の流路上を展開させて反応部位に接触させる。被検試料中に血清アミロイドAが存在する場合には、反応部位で、血清アミロイドAと、第一の粒子に結合した第一の結合物質との間、および血清アミロイドAと反応部位上の第三の結合物質との間で反応（抗原および抗体を用いた場合には、抗原抗体反応）が起こり、血清アミロイドAの量に応じた第一の粒子が反応部位上に固定される。サンドイッチ法では、反応部位上に固定した第三の結合物質と、血清アミロイドAとの反応、および血清アミロイドAと第一の粒子に結合している第一の結合物質との反応が終了した後、基板上的テストエリアおよびコントロールエリアで結合しなかった第一の粒子を除去する目的で、洗浄を行うこともできる。次いで反応部位に結合した第一の粒子からのシグナル強度を検出することで、正確な血清アミロイドAの濃度を測定することができる。なお、蛍光強度と血清アミロイドAの濃度は、正の相関関係がある。

[0064] <競合法>

競合法では、特に限定されるものではないが、例えば、以下の手順により血清アミロイドAを測定することができる。競合法は、サンドイッチ法でアッセイすることができない低分子化合物の抗原を検出する手法として当業界においてよく知られている。まず、血清アミロイドAと特異的な結合性を有

する第一の結合物質と、血清アミロイドAと特異的な結合性を有しない第二の結合物質を予め調製する。次いで第一の結合物質を第一の粒子に結合させ、第二の結合物質を第二の粒子に結合させる。また、第一の結合物質に対して結合性を有する、血清アミロイドAそのもの、または血清アミロイドAと類似な部位を持ち血清アミロイドAと同様の第一の結合物質に対するエピトープを持つ化合物を基板上に固定し反応部位とする。次に、第一の粒子と、第二の粒子を混合して容器に収納し、乾燥させる。血清アミロイドAを含む可能性のある被検試料（またはその抽出液）と、第一の粒子と第二の粒子の混合物と、界面活性剤を混合し、基板上の流路上を展開させて反応部位に接触させる。被検試料中に血清アミロイドAが存在しない場合には、第一の粒子に結合した第一の結合物質と、反応部位上に固定した第一の結合物質に対して結合性を有する血清アミロイドAそのものまたは血清アミロイドAと同様の第一の結合物質抗体に対するエピトープを持つ類似化合物とにより、基板上で反応が起こる。一方、血清アミロイドAが存在する場合には、第一の結合物質に血清アミロイドAが結合するため、第一の結合物質に対して結合性を有する、血清アミロイドAそのもの、または血清アミロイドAと類似な部位を持ち血清アミロイドAと同様の第一の結合物質抗体に対するエピトープを持つ化合物との、反応部位上における反応が阻害され、標識を有する第一の粒子が反応部位上へ固定されることが阻害される。競合法では、予め、血清アミロイドAの濃度が異なる血清アミロイドAの量が既知である試料を複数用意し、この試料および結合物質標識蛍光粒子を反応部位上に接触させつつ、反応部位からの蛍光シグナルを異なる複数の時刻で測定する。この複数の測定結果から、各血清アミロイドA濃度において、蛍光量の時間変化（傾き）を求める。この時間変化をY軸、血清アミロイドA濃度をX軸としてプロットし、最小二乗法等の適宜ふさわしいフィッティング方法を用いて、蛍光量の時間変化に対する血清アミロイドAの濃度の検量線を取得する。このように取得した検量線に基づき、目的とする被検試料を用いた蛍光量の時間変化の結果から、被検試料に含まれる血清アミロイドAの量を定量するこ

とができる。

[0065] (流路)

本発明の好ましい態様においては、血清アミロイドAを含む可能性のある被検試料（またはその抽出液）と、標識を有する第一の粒子と、界面活性剤と、さらに所望により第二の粒子とを混合した混合物を調製する。この混合物を基板上に適用し、流路に展開することができる。流路とは、被検試料と、標識を有する第一の粒子（および所望により第二の粒子）とを反応部位まで流下する通路であれば、特に制限はない。好ましい流路の態様としては、標識を有する第一の粒子（および所望により第二の粒子）を含む被検試料液を点着する点着口、第三の結合物質が固定化された反応部位としての金属薄膜、および金属薄膜を越えて流路が存在し、被検試料が、金属薄膜上を通過できる構造を有するものである。好ましくは、金属薄膜に対して、点着口とは反対側に、吸引口を設けることができる。

[0066] (標識に応じたシグナルを検出する方法)

本発明においては、標識に応じたシグナルを検出する。上記の通り標識は蛍光を発することが好ましく、この場合には、蛍光を検出することにより、標識に応じたシグナルを検出することができる。蛍光の検出方法としては、例えば、蛍光強度を検出することができる機器、具体的には、マイクロプレートリーダー、または表面プラズモン励起による蛍光検出法（SPF法）を行うためのバイオセンサーなどを用いて蛍光強度を検出することが好ましい。蛍光強度の検出は、通常、抗原抗体反応後一定時間、例えば、数分～数時間後に終了する。免疫複合体の形成の度合いを蛍光強度として検出することにより、蛍光強度と血清アミロイドAの濃度の関係から、血清アミロイドAの濃度を定量することができる。なお、蛍光の測定の形態は、プレートリーダー測定でもよいし、フロー測定でもよい。なお、SPF法は、落射励起による蛍光検出法（落射蛍光法）よりも高感度に測定することができる。

[0067] 表面プラズモン蛍光（SPF）バイオセンサーとしては、例えば、特開2008-249361号公報に記載されているような、所定波長の励起光を

透過させる材料から形成された光導波路と、この光導波路の一表面に形成された金属膜と、光ビームを発生させる光源と、上記光ビームを光導波路に通し、上記光導波路と金属膜との界面に対して表面プラズモンを発生させる入射角で入射させる光学系と、上記表面プラズモンによって増強されたエバネッセント波によって励起されたことによって発生する蛍光を検出する蛍光検出手段とを備えたセンサーを用いることができる。

[0068] (血清アミロイドAの量の測定方法)

本発明におけるSPF法での血清アミロイドAの定量方法の一例としては、以下の方法により血清アミロイドAを定量することができる。具体的には、各濃度既知の血清アミロイドAを含む試料を準備し、蛍光を検出する部位を流下させつつ、蛍光検出部位からの蛍光シグナルを異なる複数の時刻で測定する。この複数の測定結果から、各血清アミロイドA濃度において、蛍光量の時間変化（傾き）を求める。この時間変化をY軸、血清アミロイドA濃度をX軸としてプロットし、最小二乗法等の適宜ふさわしいフィッティング方法を用いて、蛍光量の時間変化に対する血清アミロイドA濃度の検量線を取得する。光シグナルシステムとしては、血清アミロイドAごとに対応する検量線に基づき、目的とする被検試料の血清アミロイドA量を特定することができる。

[0069] 本発明における表面プラズモン励起による蛍光検出（SPF）系は、基板上の金属薄膜上に固定化された血清アミロイドAの量に依存した蛍光物質からの蛍光を検出するアッセイ方法であり、溶液中での反応の進行により、光学的な透明度の変化を、例えば濁度として検出する、いわゆるラテックス凝集法とは異なる方法である。ラテックス凝集法では、ラテックス試薬中の抗体感作ラテックスと検体中の抗原が、抗体反応により結合し、凝集する。この凝集塊は時間と共に増大し、この凝集塊に近赤外光を照射して得られた単位時間当たりの吸光度変化から、抗原濃度を定量化する方式が、ラテックス凝集法である。本発明では、ラテックス凝集法に比べて、非常に簡便な血清アミロイドAの検出方法を提供できる。

[0070] 以下に、本発明の実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明する。なお、以下の実施例に示される材料、使用量、割合、処理内容、処理手順等は、本発明の趣旨を逸脱しない限り適宜変更することができる。したがって、本発明の範囲は以下に示す具体例により限定的に解釈されるべきものではない。以下の化学式においてEtはエチルを示す。

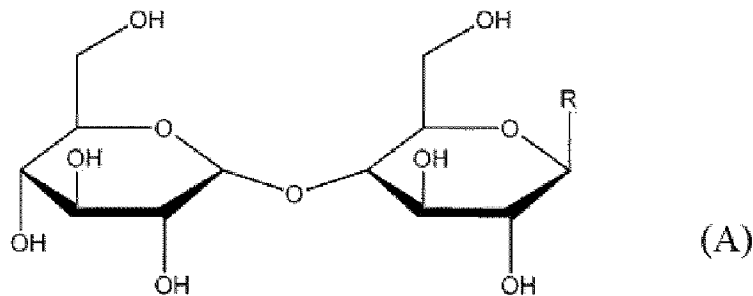
### 実施例

[0071] 以下の界面活性剤を使用した。

D316：n-ドデシル-β-D-マルトシド（同仁化学社製）、下記式（A）においてRがドデシルオキシ基である化合物

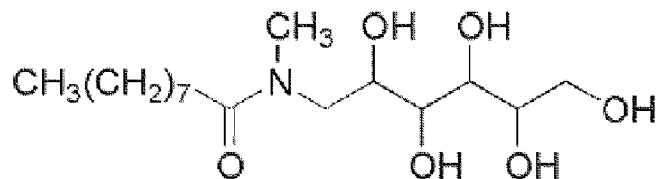
D382：n-デシル-β-D-マルトシド（同仁化学社製）、下記式（A）においてRがデシルオキシ基である化合物

[化9]



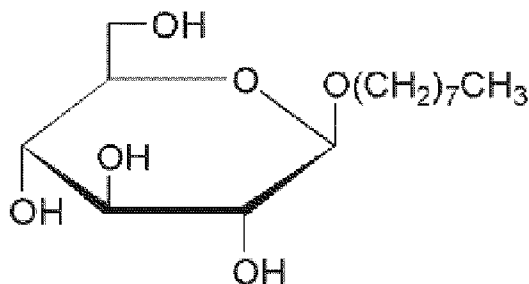
[0072] MEGA-9：n-ノナノイル-N-メチル-D-グルカミン（同仁化学社製）

[化10]



[0073] OOO1：n-オクチル-β-D-グルコピラノシド（同仁化学社製）

[化11]



[0074] ラウレス 9 : P O E ( 9 ) ラウリルエーテル ( 日本エマルジョン社製 E M A L E X ( 登録商標 ) 7 0 9 )

ラウレス 1 5 : P O E ( 1 5 ) ラウリルエーテル ( 日本エマルジョン社製 E M A L E X ( 登録商標 ) 7 1 5 )

[0075] S D S : ドデシル硫酸ナトリウム ( イオン性界面活性剤、和光純薬製 )

ジメチルジステアリルアンモニウムクロリド ( イオン性界面活性剤、和光純薬製 )

ラウレス 2 0 : P O E ( 2 0 ) ラウリルエーテル ( 日本エマルジョン社製 E M A L E X ( 登録商標 ) 7 2 0 )

[0076] < 実施例 1 >

( 1 ) 平均粒子径 1 5 0 n m ラテックス粒子の製造

スチレン ( 和光純薬社製 ) 3 0 g ( 2 8 8 m m o l ) とアクリル酸 ( 和光純薬社製 ) 3 g ( 4 2 m m o l ) を超純水 4 4 0 m L に懸濁させ、9 5 ° C に昇温し、過硫酸カリウム ( K P S ) ( 和光純薬社製 ) 1 g を超純水 1 0 m L に溶解させた水溶液を添加し、9 5 ° C 、 2 5 0 r p m で 6 時間攪拌した。その後、1 0 , 0 0 0 r p m で 6 時間遠心分離を 3 回行い、ラテックス粒子を得た。最後に、得られたラテックス粒子を超純水に再分散させた。固形分濃度が 1 質量% となるように、純水を添加して希釈液を調製した。粒径アナライザー F P A R - 1 0 0 0 ( 大塚電子 ( 株 ) ) を用いて、温度 2 5 ° C で測定したメジアン径 ( d = 5 0 ) として求めたところ、ラテックス粒子の平均粒子径は 1 5 0 n m であった。

[0077] (2) 蛍光ラテックス粒子の作製

上記のように作製した平均粒子径150nmのラテックス粒子の固形分濃度2質量%の水分散液100mLにメタノール100mLを加え、10分間、室温で攪拌した。一方、別途用意したN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)1mL、CHCl<sub>3</sub>9mLおよびエタノール16mLに溶解させた蛍光色素(NK136、林原生物化学研究所製)12mgを60分間かけてゆっくりラテックス溶液に滴下した。滴下完了後、エバポレーターで有機溶媒を減圧留去した後、遠心分離とリン酸緩衝生理食塩水(PBS)水溶液への再分散を3回繰り返し、精製を行うことで、蛍光ラテックス粒子を調製した。

[0078] (3) モノクローナル抗体の作製

抗SAAモノクローナル抗体(Anti-SAA)および抗CRP(C反応性タンパク質)モノクローナル抗体(MM50175)は、マウス腹水法を用いて、以下のように作製した。

Hytest社より購入したSAAを用いて、マウスに免疫した後に脾臓細胞を抽出し、ミエローマ(製品名P3-X63-Ag8-U1、コスボバイオ社製)と混合し、ポリエチレングリコール(PEG)法にて細胞融合を実施した。使用細胞としては、最終免疫してから3日後に採取した脾臓細胞を使用した。細胞比は、脾臓細胞:ミエローマ=10:1とした。細胞播種は、脾臓細胞として $0.5 \sim 1.0 \times 10^5$  cells/wellで96well plateに播種した。使用した培地は、RPMI-1640(Roswell Park Memorial Institute medium)、10%FBS(ウシ胎児血清:Fetal bovine serum)、およびHAT(ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン混合培地、hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium)を適宜使用した。最終的に増殖した融合細胞(ハイブリドーマ)をマウス腹腔内に注射し、一定期間の経時後に腹水を取り出し、遠心分離、精製工程を経て得られたものを抗SAAモノクローナル抗体(A

nt i - S A A) として採取した。また、抗 S A A モノクローナル抗体の作製と同様にして、大腸菌の培養液から精製した C R P (オリエンタル酵母工業 (株) 社製) を用いて、抗 C R P モノクローナル抗体 (M M 5 0 1 7 5) を作製した。

[0079] (4) 抗 S A A 抗体で修飾した蛍光ラテックス粒子の調製

抗 S A A 抗体で修飾した蛍光粒子を、以下の通り調製した。

2 質量% (固形分濃度) 蛍光ラテックス粒子水溶液 (平均粒子径 1 5 0 n m) 2 7 5  $\mu$  L に、5 0 m m o l / L の M E S (2 - (N - m o r p h o l i n o) e t h a n e s u l f o n i c a c i d) バッファー (p H 6 . 6) 溶液 8 8  $\mu$  L を加え、5 m g / m L の抗 S A A モノクローナル抗体 (A n t i - S A A) 1 7 6  $\mu$  L を添加し、室温で 1 5 分間攪拌した。その後、1 0 m g / m L の E D C (1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩、和光純薬社製) 水溶液を 5  $\mu$  L 加え、室温で 2 時間攪拌した。2 m o l / L の G l y c i n e (和光純薬社製) 水溶液を 8 . 8  $\mu$  L 添加して 1 5 分間攪拌した後、遠心分離 (1 5 , 0 0 0 r p m、4  $^{\circ}$  C、1 5 分) を行い、蛍光ラテックス粒子を沈降させた。その後上清を取り除き、P B S 溶液 (p H 7 . 4) を 5 0 0  $\mu$  L 加え、超音波洗浄機により蛍光ラテックス粒子を再分散させた。再度、遠心分離 (1 5 , 0 0 0 r p m、4  $^{\circ}$  C、1 5 分) を行って上清を除いた後、1 質量% B S A を含む P B S (p H 7 . 4) 溶液 5 0 0  $\mu$  L を加えて、蛍光ラテックス粒子を再分散させることで、抗 S A A 抗体結合蛍光ラテックス粒子の 1 質量% 溶液を調製した。

[0080] (5) 蛍光標識をしない抗 C R P 抗体で修飾したラテックス粒子の作製

2 質量% (固形分濃度) ラテックス粒子水溶液 (平均粒子径 1 5 0 n m) 3 0 0  $\mu$  L に、2 5 0 m m o l / L の M E S バッファー (p H 5 . 6) 溶液 9 6  $\mu$  L および超純水 2 5 m L を加え、さらに 5 m g / m L の抗 C R P モノクローナル抗体 (M M 5 0 1 7 5) 1 8 2  $\mu$  L を添加した。得られた混合物を室温で 1 5 分間攪拌した。その後、1 0 m g / m L の E D C (N - e t h y l - N ' - (3 - d i m e t h y l a m i n o p r o p y l) c a r b o

d i i m i d e) 水溶液 9.6  $\mu$ L を加え、得られた混合物を室温で 2 時間攪拌した。2 mol/L のグリシン (和光純薬 (株) 社製) 水溶液を 30  $\mu$ L 添加して、得られた混合物を 30 分間攪拌した後、遠心分離 (15,000 rpm、4℃、15 分) を行い、ラテックス粒子を沈降させた。上清を取り除き、沈殿物に PBS 溶液 (pH 7.4) を 600  $\mu$ L 加え、超音波洗浄機によりラテックス粒子を再分散させた。再度、遠心分離 (15,000 rpm、4℃、15 分) を行って上清を除いた後、沈殿物に 1 質量% BSA を含む PBS (pH 7.4) 溶液 600  $\mu$ L を加えて、ラテックス粒子を再分散させた。このようにして抗 CRP 抗体結合蛍光ラテックス粒子の 1 質量% 溶液を調製した。

[0081] (6) 乾燥粒子の作製

超純水 240  $\mu$ L、20 質量% スクロース水溶液 417  $\mu$ L、20 質量% BSA 水溶液 229  $\mu$ L、1 質量% 抗 SAA 抗体修飾蛍光ラテックス粒子 (平均粒子径 150 nm) 125  $\mu$ L を混合した。ポリプロピレン (プライムポリマー社製、プライムポリプロ ランダム PP グレード) を基体としたカップを準備し、上記の混合液 20  $\mu$ L を点着した。その後、スーパードライ乾燥機 (TOYO リビング社、ウルTRASーパードライ 00 シリーズ) を用いて、12 時間かけて含水量を 25% 以下となるまで乾燥させ、その後、25℃ 50% RH (相対湿度) の環境で 15 日間保存することで、実施例 1 で使用した乾燥粒子を作製した。

[0082] また、下記の実施例 2、比較例 4 に使用した乾燥粒子の作製においては、上記で調製した蛍光標識をしない抗 CRP 抗体で修飾したラテックス粒子を、抗 SAA 抗体修飾蛍光ラテックス粒子の質量に対して 5 倍量混合し、他は同様に乾燥粒子を調製した。

[0083] (7) 基板の作製

ポリメチルメタクリレート (PMMA、三菱レイヨン社製、アクリペット VH-001) を基体とした基板の片面に、テストエリアおよびコントロールエリア共に幅 4 mm、厚さが 36 nm となるように、テストエリアに用い

る金膜と、その隣に、コントロールエリアに用いる金膜とを、マグネトロンスパッタリング法により作製した。この基板を幅5 mmとなるように裁断して基板を作製した。この基板のテストエリアの金膜上には、抗SAAモノクローナル抗体を含む液（濃度：10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 150 mmol NaCl）を点着し、1時間、25℃にてインキュベートし、物理吸着させて固定化を行った。

[0084] (8) 基板の洗浄およびブロッキング

このように調製した基板をセンサチップの流路に取り付ける前に、予め調製した洗浄用溶液（0.05質量% Tween（登録商標）20（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート、和光純薬社製）を含むPBS溶液（pH 7.4））を300  $\mu\text{L}$ 用いて3回繰り返し洗浄した。洗浄終了後、金膜上の抗体の未吸着部分のブロッキングを行うため、1質量%カゼイン（Thermo Scientific社製）を含むPBS溶液（pH 7.4）を300  $\mu\text{L}$ 添加し、1時間、室温で静置した。上記の洗浄用溶液で洗浄後、安定化剤としてImmunoassay Stabilizer（ABI社製）300  $\mu\text{L}$ を添加し、室温で30分間放置し、溶液を除去して乾燥機を用いて水分を完全に取り除いた。

[0085] (9) センサチップの作製

特開2010-190880号公報の第2の実施形態の構成となるように、作製した基板を流路に封入し、流路型センサチップを作製した。その概略図を図1および図2に示した。図1は、センサチップ1の概略図であり、図2は、センサチップ1の分解図である。センサチップ1は、上部部材2、中間部材3および基板4から構成されている。上部部材2には、第一の容器5および第二の容器6が設けられている。なお、第一の容器5および第二の容器6を併せて、容器群7と称する。基板4には、流路10が形成されており、流路10の上には、検出領域8および参照領域9が形成されている。

[0086] (10) 被検試料の準備

ネコの血清は、北山ラベスから購入した交雑種の血清を使用し、被検物質

である血清アミロイドAの濃度が異なる被検試料（検体）N o. 1 および N o. 2 を用意した。

[0087] （11）蛍光粒子を用いたSAAの免疫測定

（10）で準備した被検試料（ネコの血清）10  $\mu$ L と、非イオン性界面活性剤であるD316（同仁化学製）の生理食塩水溶液90  $\mu$ L を十分に混合して、被検試料の混合液1を作製した。この混合液の界面活性剤D316の濃度は、0.25質量%であった。次に、（4）で調製した、抗SAA抗体標識蛍光粒子を点着し乾燥させたカップに、作製した混合液1を添加し、10分間、十分に攪拌した。次に、上記で作製した基板を封入した流路型センサチップの注入口に蛍光粒子と混合した混合液1を点着した。点着後、ポンプ吸引を行いながら混合液1を10  $\mu$ L /minの速度で流路を流下させ、SAA抗体を固定した金膜面上の蛍光強度を1.5分間継続して測定した。各基板において得られた蛍光強度の単位時間における蛍光シグナル値の増加速度を被検試料N o. 1、2に対してそれぞれ求めた。

[0088] ＜実施例2＞

実施例1で使用した抗SAA抗体で修飾した蛍光ラテックス粒子に対して、蛍光標識をしない抗CRP抗体で修飾したラテックス粒子を、質量比で5倍量、追加で加えた乾燥粒子を調製し、使用したこと以外は、実施例1と同様にして、蛍光シグナル値の増加速度を被検試料N o. 1 および N o. 2 に対してそれぞれ求めた。

[0089] ＜実施例3～9＞

実施例1において、界面活性剤D316の代わりに、表1に示した界面活性剤および濃度に変更したこと以外は実施例1と同様にして、蛍光シグナル値の増加速度を被検試料N o. 1 および N o. 2 に対してそれぞれ求めた。

[0090] ＜比較例1～3＞

界面活性剤を実施例1のものから以下の表に記載したものに変更すること以外の作業は実施例1と同様に行い、蛍光シグナル値の増加速度を被検試料N o. 1 および N o. 2 に対してそれぞれ求めた。

## [0091] &lt;比較例 4&gt;

比較例 3 において使用した抗 S A A 抗体で修飾した蛍光ラテックス粒子に対して、蛍光標識をしない抗 C R P 抗体で修飾したラテックス粒子を、質量比で 5 倍量、追加で加えた乾燥粒子を調製し、使用したこと以外は、比較例 3 と同様にして、蛍光シグナル値の増加速度を被検試料 N o . 1 および N o . 2 に対してそれぞれ求めた。

## [0092] (1 2) 対照キットによる測定

免疫測定で、当業者により使用されている E L I S A キット ( P h a s e S A A A s s a y ( c a t . n o . T P - 8 0 2 ) : T r i d e l t a 社製対照キット) を用い、取り扱い説明書に従い、被検試料中の血清アミロイド A の測定を行い被検試料 N o . 1 および N o . 2 の S A A 濃度を測定した。被検試料 N o . 1 および N o . 2 の S A A 濃度は、 $43.8 \mu\text{g}/\text{mL}$  と  $4.1 \mu\text{g}/\text{mL}$  であった。測定開始のシグナル値に対する 1.5 分間測定を継続した後のシグナル値の比をシグナル傾きとして求め、N o . 1 および N o . 2 のシグナル傾きの平均値を求めた。

[0093] 結果を表 1 に示した。シグナル傾きが、2.0 以上であれば、被検試料中の S A A 濃度を実用的に検出することが可能であり、9.5 以上であれば、より精度良く検出することが可能となる。

[0094]

[表1]

|       | 界面活性剤                       | 分子量     |       | 濃度     | ダミー粒子 | シグナルの傾き |
|-------|-----------------------------|---------|-------|--------|-------|---------|
| 実施例 1 | D 3 1 6                     | 5 1 1   | 非イオン性 | 0. 2 5 |       | 1 1. 8  |
| 実施例 2 | D 3 1 6                     | 5 1 1   | 非イオン性 | 0. 2 5 | 添加    | 1 2. 3  |
| 実施例 3 | D 3 8 2                     | 4 8 3   | 非イオン性 | 0. 3   |       | 2 1     |
| 実施例 4 | MEGA-9                      | 3 3 5   | 非イオン性 | 2. 3   |       | 2 3     |
| 実施例 5 | MEGA-9                      | 3 3 5   | 非イオン性 | 7      |       | 5. 2    |
| 実施例 6 | MEGA-9                      | 3 3 5   | 非イオン性 | 0. 1   |       | 3. 4    |
| 実施例 7 | O 0 0 1                     | 2 9 2   | 非イオン性 | 0. 2   |       | 9. 1    |
| 実施例 8 | ラウレス 9                      | 5 8 3   | 非イオン性 | 0. 3   |       | 5. 8    |
| 実施例 9 | ラウレス 1 5                    | 8 5 8   | 非イオン性 | 0. 3   |       | 3. 1    |
| 比較例 1 | SDS                         | 2 8 8   | アニオン  | 0. 4   |       | 0. 1    |
| 比較例 2 | ジメチルジステア<br>ルアンモニウムクロ<br>リド | 5 8 7   | カチオン  | 0. 4   |       | 0. 2    |
| 比較例 3 | ラウレス 2 0                    | 1 0 6 7 | 非イオン性 | 0. 4   |       | 0. 3 2  |
| 比較例 4 | ラウレス 2 0                    | 1 0 6 7 | 非イオン性 | 0. 4   | 添加    | 0. 5 5  |

[0095] 表 1 の結果から、非イオン系の界面活性剤（ノニオン）で分子量 1 0 0 0 以下の界面活性剤を用いることで、本発明の効果が発現することが確認された。

[0096] <実施例 1 0>

（ 1 3 ） 乾燥粒子の作製

実施例 2 において、乾燥粒子の作製を終了した乾燥粒子を含むカップに、実施例 2 の（ 1 1 ）での被検試料の混合液の作製において使用した D 3 1 6 を、予め乾燥粒子に加えるため、3. 0 重量パーセント濃度の D 3 1 6 水溶液 1 0  $\mu$  L を加えて十分に混合し、その後、スーパードライ乾燥機（T O Y O リビング社、ウルTRASーパードライ 0 0 シリーズ）を用いて、1 2 時間かけて含水量を 2 5 % 以下となるまで乾燥させ、引き続き、2 5  $^{\circ}$  C 5 0 % R

H（相対湿度）の環境で15日間保存することで、乾燥粒子を作製した。

[0097] (14) 蛍光粒子を用いたSAA粒子の免疫測定

上記の(10)で準備した被検試料（ネコの血清）10 $\mu$ Lと、上記(11)で使用したD316の生理食塩水溶液90 $\mu$ Lの代わりに、D316を除いた生理食塩水90 $\mu$ Lを十分に混合した以外は実施例2と同様にして、被検試料の混合液14を調製した。この混合液14の界面活性剤D316の濃度は、0.30質量%であった。次に、(13)で調製した抗SAA抗体標識蛍光粒子を点着し乾燥させたカップに混合液14を添加し、10分間、十分に攪拌した。次いで、実施例2と同様にして、流路型センサチップの注入口に蛍光粒子を含有する混合液14を点着し、測定開始のシグナル値に対する1.5分間測定を継続した後のシグナル値の比をシグナル傾きとして求め、被検試料No. 1およびNo. 2のシグナル傾きの平均値を求めた。結果を表2に示した。

[0098] <実施例11～13>

実施例10の(13)で調製した乾燥粒子を用いて、(14)に記載した混合液14の調製において、生理食塩水による希釈なし（倍率1倍；実施例11）、生理食塩水による希釈が5倍（実施例12）、生理食塩水による希釈が100倍（実施例13）となるように、被検試料（ネコの血清）に対する生理食塩水の混合比を適宜変更して被検試料の混合液15～17を調製し、実施例10と同様にして、測定開始のシグナル値に対する1.5分間測定を継続した後のシグナル値の比をシグナル傾きとして求め、被検試料No. 1およびNo. 2のシグナル傾きの平均値を求めた。結果を表2に示した。

[0099] (15) 検量線の作成

続いて、北山ラベスから購入した交雑種の血清を使用し、被検物質の濃度が異なる被検試料（検体）No. 3～7を用意した。上記(12)に記載の対照キットによる測定を行ってSAA濃度を測定したところ、それぞれ2.9 $\mu$ g/mL、5.5 $\mu$ g/mL、60.8 $\mu$ g/mL、111.0 $\mu$ g/mL、159.1 $\mu$ g/mLであった。この被検試料（検体）No. 3～7

を用いて、実施例 1 で使用したチップと同じ流路型センサチップを用いてそれぞれ、被検試料（検体）No. 3～7 のシグナルを測定し、実施例 10～13 に対する検量線をそれぞれ作成した。

[0100] (16) 多検体相関の測定

動物病院にて採血された様々な種類のネコ血清 500 検体について、実施例 2 と同様に被検試料である検体の混合液を調製してそれぞれシグナルを測定し、(15) で作成した検量線から SAA 濃度をそれぞれ算出し、(12) で記載した対照キットにより測定した既知濃度との相関を評価した結果を「多検体相関」の結果として表 2 に示した。

[0101] <多検体相関の評価基準>

A：良好（500 検体の本発明による SAA 測定値と対照キットの測定による SAA 測定値との相関プロットの線形近似線の相関係数 R が 0.90 以上）

B：比較的良好（500 検体の本発明による SAA 測定値と対照キットの測定による SAA 測定値との相関プロットの線形近似線の相関係数 R が 0.80 以上 0.90 未満）

C：不十分（500 検体の本発明による SAA 測定値と対照キットの測定による SAA 測定値との相関プロットの線形近似線の相関係数 R が 0.80 未満）

結果を表 2 に示した。

[0102] [表2]

|       | 希釈倍率    | シグナル傾き | 多検体相関 |
|-------|---------|--------|-------|
| 実施例10 | 10倍     | 13.5   | A     |
| 実施例11 | 1倍（無希釈） | 12.7   | B     |
| 実施例12 | 5倍      | 13.6   | A     |
| 実施例13 | 100倍    | 13.1   | A     |

[0103] 表 2 の結果から、被検試料の生理食塩水による希釈倍率が 1 倍から 100 倍の間では、シグナルの傾きがいずれも 9.5 以上であり、より精度良く S

A Aを検出することが可能であることが分かった。その中で、界面活性剤D 3 1 6を用いた本発明において、多検体相関の結果から、希釈倍率が1倍から100倍の間で比較的良好な相関が得られているが、その中でも希釈倍率が5倍から100倍の実施例では、多くの試料を測定してもS A Aをより正確に測定できることが確認された。

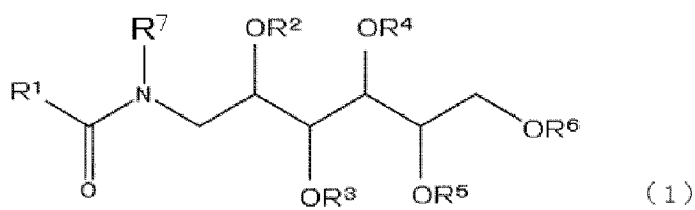
### 符号の説明

- [0104] 1 センサチップ  
2 上部部材  
3 中間部材  
4 基板  
5 第一の容器  
6 第二の容器  
7 容器群  
8 検出領域  
9 参照領域  
10 流路

## 請求の範囲

- [請求項1] 血清アミロイドAと特異的な結合性を有する第一の結合物質により修飾され、かつ標識を有する第一の粒子と、少なくとも一種の分子量1000以下の非イオン性界面活性剤とを含む、血清アミロイドAの測定のための試薬キット。
- [請求項2] 前記界面活性剤が、グルカミン骨格を有する化合物である、請求項1に記載の試薬キット。
- [請求項3] 前記界面活性剤が、下記式(1)で表される化合物である、請求項1または2に記載の試薬キット。

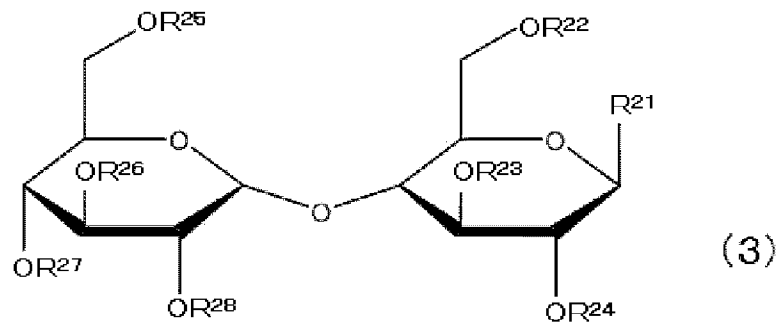
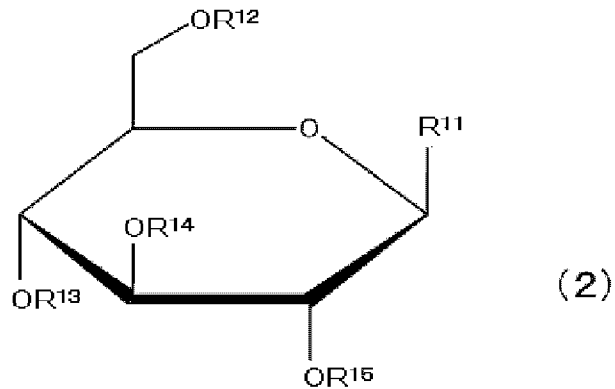
[化1]



式中、 $R^1$ は、置換されていてもよい炭化水素基を示し、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ および $R^6$ はそれぞれ独立に、水素原子、または置換されていてもよい炭化水素基を示す。但し、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ および $R^6$ のうち少なくとも3つは水素原子である。 $R^7$ は、置換されていてもよい炭化水素基を示す。

- [請求項4] 前記界面活性剤が、疎水性基を有する単糖類または疎水性基を有する二糖類である、請求項1に記載の試薬キット。
- [請求項5] 前記界面活性剤が、グルコース骨格またはマルトース骨格を有する化合物である、請求項4に記載の試薬キット。
- [請求項6] 前記界面活性剤が、下記式(2)または下記式(3)で表される化合物である、請求項1、4および5の何れか一項に記載の試薬キット。

[化2]



式中、 $R^{11}$ は、置換されていてもよいアルコキシ基、置換されていてもよいアルケニルオキシ基、置換されていてもよいアルキニルオキシ基、置換されていてもよいアルキルチオ基、置換されていてもよいアルケニルチオ基、置換されていてもよいアルキニルチオ基を示し、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 、 $R^{14}$ および $R^{15}$ はそれぞれ独立に、水素原子、または置換されていてもよい炭化水素基を示す。但し、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 、 $R^{14}$ および $R^{15}$ のうち少なくとも3つは水素原子である。

式中、 $R^{21}$ は、置換されていてもよいアルコキシ基、置換されていてもよいアルケニルオキシ基、置換されていてもよいアルキニルオキシ基、置換されていてもよいアルキルチオ基、置換されていてもよいアルケニルチオ基、置換されていてもよいアルキニルチオ基を示し、 $R^{22}$ 、 $R^{23}$ 、 $R^{24}$ 、 $R^{25}$ 、 $R^{26}$ 、 $R^{27}$ および $R^{28}$ はそれぞれ独立に、水素原子、または置換されていてもよい炭化水素基を示す。但し

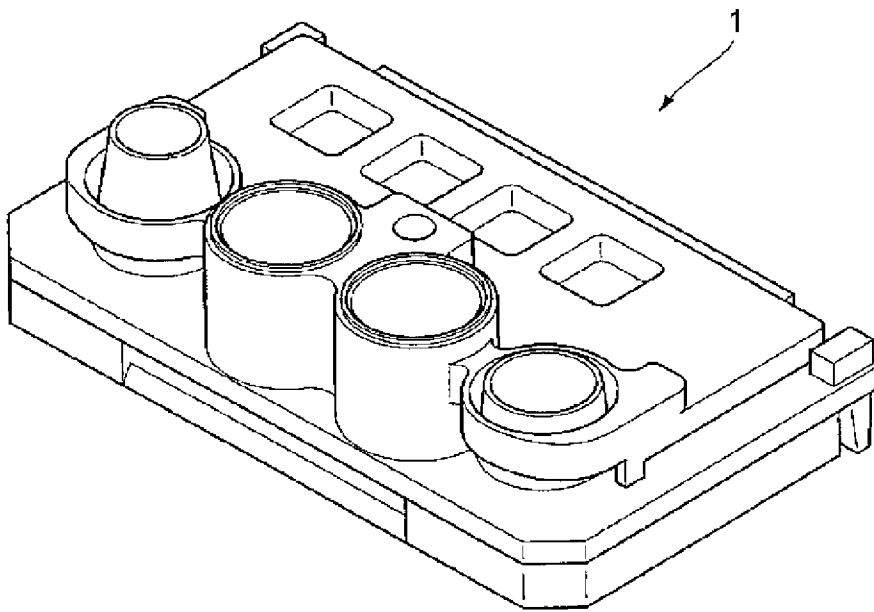
、 $R^{22}$ 、 $R^{23}$ 、 $R^{24}$ 、 $R^{25}$ 、 $R^{26}$ 、 $R^{27}$ および $R^{28}$ のうち少なくとも3つは水素原子である。

- [請求項7] 前記第一の粒子が、ラテックス粒子である、請求項1から6のいずれか一項に記載の試薬キット。
- [請求項8] 前記第一の粒子の平均粒径が70nm以上500nm以下である、請求項1から7のいずれか一項に記載の試薬キット。
- [請求項9] 前記標識が蛍光色素を含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の試薬キット。
- [請求項10] 前記第一の結合物質が抗体である、請求項1から9のいずれか一項に記載の試薬キット。
- [請求項11] 血清アミロイドAと特異的な結合性を有しない第二の結合物質により修飾され、かつ標識を有しない第二の粒子をさらに含む、請求項1から10のいずれか一項に記載の試薬キット。
- [請求項12] 請求項1から11のいずれか一項に記載の試薬キットと、血清アミロイドAまたは前記第一の結合物質と特異的な結合性を有する第三の結合物質が固定されている第一の金属膜が形成された基板とを含む、血清アミロイドAのための測定キット。
- [請求項13] 前記基板に、血清アミロイドAと結合性を有さず、前記第一の結合物質と特異的な結合性を有する第四の結合物質が固定された第二の金属膜がさらに形成されている、請求項12に記載の測定キット。
- [請求項14] 血清アミロイドAを含む生体試料と、血清アミロイドAと特異的な結合性を有する第一の結合物質により修飾され、かつ標識を有する第一の粒子と、少なくとも一種の分子量1000以下の非イオン性界面活性剤とを含む混合液を調製する工程；  
血清アミロイドAと特異的な結合性を有する第三の結合物質が固定されている第一の金属膜が形成された基板の一端の注入口に、前記混合液を添加する工程；  
前記混合液を前記基板上に流下させる工程；および、

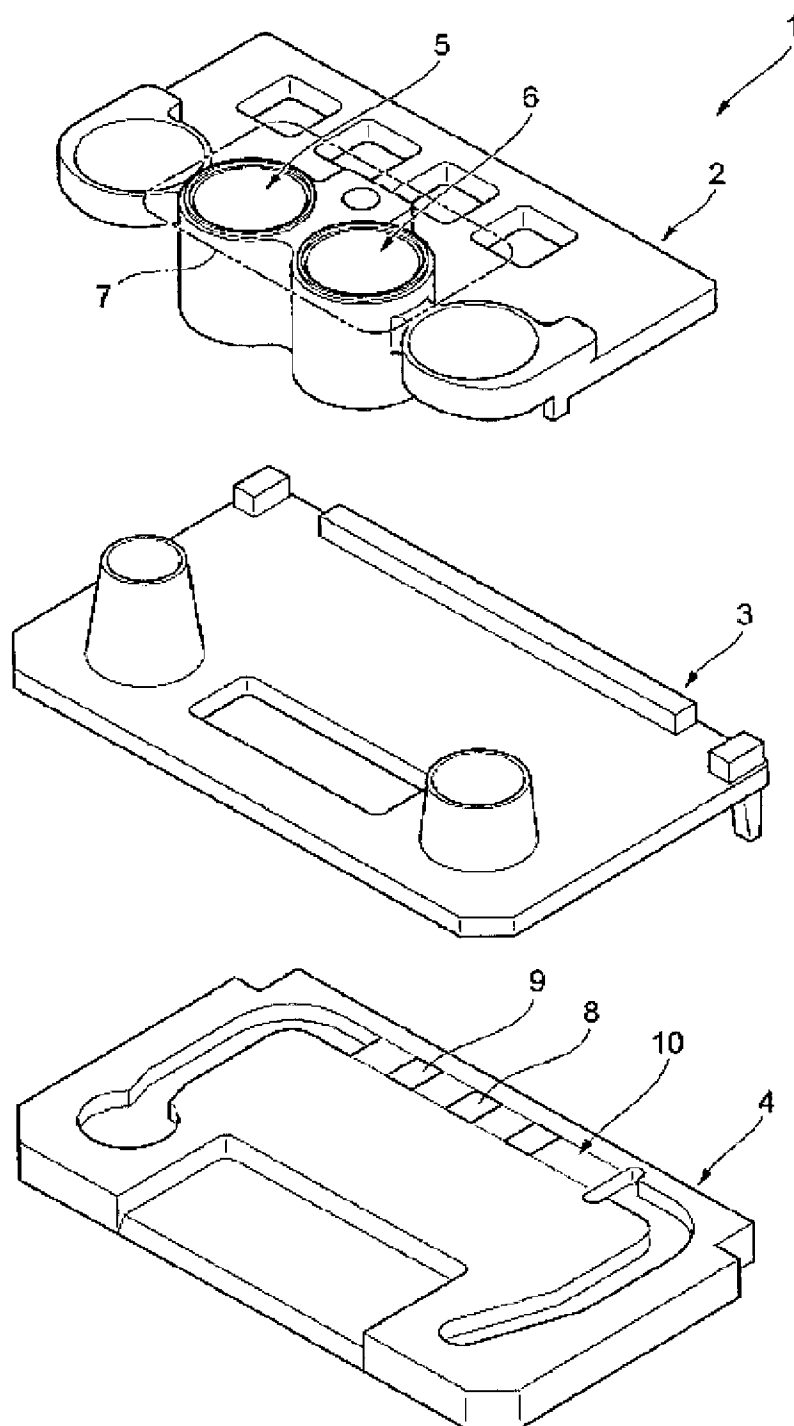
前記第一の金属膜上の標識の情報を取得する工程、  
を含む、生体試料中の血清アミロイドAの測定方法。

- [請求項15] 前記混合液中の前記界面活性剤の濃度が0.01質量%以上10質量%以下である、請求項14に記載の血清アミロイドAの測定方法。
- [請求項16] 前記混合液を調製する工程が、前記生体試料に対して5倍以上希釈された混合液を調製する工程である、請求項14または15に記載の血清アミロイドAの測定方法。

[図1]



[図2]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/010920

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. G01N33/53 (2006.01) i, G01N33/543 (2006.01) i, G01N33/545 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. G01N33/53, G01N33/543, G01N33/545

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 | 1971-2019 |
| Registered utility model specifications of Japan         | 1996-2019 |
| Published registered utility model applications of Japan | 1994-2019 |

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                            | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | JP 2009-537018 A (OXFORD BIOSENSORS LIMITED) 22 October 2009, entire text, in particular, see claims, etc. & JP 2009-537019 A & US 2009/0130696 A1, entire text, in particular, see claims, etc. & US 2009/0203054 A1 & WO 2007/132222 A1 & WO 2007/132223 A1 & EP 2018568 A1 & EP 2027471 A1 | 1-16                  |
| Y         | CN 107015004 A (SHENZHEN HUISONG TECHNOLOGY DEVELOPMENT CO., LTD.) 04 August 2017, entire text, in particular, see claims, paragraph [0021], etc. (Family: none)                                                                                                                              | 1-16                  |



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

"I" 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  
29 May 2019 (29.05.2019)

Date of mailing of the international search report  
11 June 2019 (11.06.2019)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/010920

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                               | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | JP 2010-190880 A (FUJIFILM CORP.) 02 September 2010, entire text, all drawings, in particular, see claims, paragraphs [0046]-[0056], [0103]-[0116], fig. 3, 4, 24, etc. & US 2009/0261269 A1, entire text, all drawings, in particular, see claims, paragraphs [0107]-[0126], [0194]-[0212], fig. 3, 4, 24, etc. & EP 2110658 A1 | 1-16                  |
| A         | JP 09-104699 A (EIKEN CHEMICAL CO., LTD.) 22 April 1997, entire text, in particular, see claims, etc. & WO 1997/006184 A1                                                                                                                                                                                                        | 1-16                  |
| A         | WO 2009/116268 A1 (SEKISUI MEDICAL CO., LTD.) 24 September 2009, see entire text, in particular, claims, paragraph [0050], etc. & US 2011/0091993 A1 & US 2013/0302826 A1 & EP 2256497 A1                                                                                                                                        | 1-16                  |
| A         | JP 2006-017745 A (EIKEN CHEMICAL CO., LTD.) 19 January 2006, see entire text, etc. (Family: none)                                                                                                                                                                                                                                | 1-16                  |
| A         | JP 08-178921 A (COSMO SOGO KENKYUSHO KK) 12 July 1996, see entire text, etc. (Family: none)                                                                                                                                                                                                                                      | 1-16                  |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i, G01N33/545(2006.01)i

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/53, G01N33/543, G01N33/545

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |            |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報   | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2019年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2019年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2019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 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Y               | JP 2009-537018 A (オックスフォード バイオセンサーズ リミテッド)<br>2009.10.22, 全文、特に、[特許請求の範囲] 等参照 & JP 2009-537019 A<br>& US 2009/0130696 A1, 全文、特に、特許請求の範囲等参照<br>& US 2009/0203054 A1 & WO 2007/132222 A1 & WO 2007/132223 A1<br>& EP 2018568 A1 & EP 2027471 A1 | 1-16           |
| Y               | CN 107015004 A (SHENZHEN HUISONG TECHNOLOGY DEVELOPMENT CO., LTD)<br>2017.08.04, 全文、特に、特許請求の範囲、段落 [0021] 等参照 (ファミリーなし)                                                                                                                        | 1-16           |

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

「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  
「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  
「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)  
「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

「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  
「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  
「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  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.05.2019

国際調査報告の発送日

11.06.2019

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

草川 貴史

2 J

4075

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                                     |                |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
| Y                     | JP 2010-190880 A (富士フイルム株式会社) 2010.09.02, 全文・全図、特に、[特許請求の範囲]、段落 [0046] – [0056]、[0103] – [0116]、[図3]、[図4]、[図24] 等参照 & US 2009/0261269 A1, 全文・全図、特に、特許請求の範囲、段落 [0107] – [0126], [0194] – [0212], F i g. 3, 4, 24 等参照 & EP 2110658 A1 | 1-16           |
| A                     | JP 09-104699 A (栄研化学株式会社) 1997.04.22, 全文、特に、[特許請求の範囲] 等参照 & WO 1997/006184 A1                                                                                                                                                       | 1-16           |
| A                     | WO 2009/116268 A1 (積水メディカル株式会社) 2009.09.24, 全文、特に、[特許請求の範囲]、段落 [0050] 等参照 & US 2011/0091993 A1 & US 2013/0302826 A1 & EP 2256497 A1                                                                                                 | 1-16           |
| A                     | JP 2006-017745 A (栄研化学株式会社) 2006.01.19, 全文等参照 (ファミリーなし)                                                                                                                                                                             | 1-16           |
| A                     | JP 08-178921 A (株式会社コスモ総合研究所) 1996.07.12, 全文等参照 (ファミリーなし)                                                                                                                                                                           | 1-16           |