

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-145256

(P2006-145256A)

(43) 公開日 平成18年6月8日(2006.6.8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 1 A
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 2 5 G
	GO 1 N 33/543	5 2 5 U
	GO 1 N 33/553	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2004-332398 (P2004-332398)	(71) 出願人	000002174 積水化学工業株式会社
(22) 出願日	平成16年11月16日 (2004.11.16)	(72) 発明者	岡 孝之 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内

(54) 【発明の名称】 磁性体内包粒子、免疫測定用粒子及びイムノクロマトグラフィ法

(57) 【要約】

【課題】 クロマト支持体中に滞留してしまったり、展開させる側のクロマト先端部位付近に不均一に残留してしまったりすることのないクロマト展開性に優れる磁性体内包粒子、免疫測定用粒子及びこれを用いたイムノクロマトグラフィ法を提供する。

【解決手段】 有機高分子物質と、前記有機高分子物質中に分散径1～30nmで分散した磁性体とからなる磁性体内包粒子であって、平均粒子径が50～300nm、かつ、0.01Nの塩化ナトリウム水溶液中で測定されるゼータ電位が-10～-50mVである磁性体内包粒子。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

有機高分子物質と、前記有機高分子物質中に分散径 1 ~ 30 nm で分散した磁性体とからなる磁性体内包粒子であって、平均粒子径が 50 ~ 300 nm、かつ、0.01 N の塩化ナトリウム水溶液中で測定されるゼータ電位が -10 ~ -50 mV であることを特徴とする磁性体内包粒子。

【請求項 2】

磁性体は、超常磁性を有するものであることを特徴とする請求項 1 記載の磁性体内包粒子。

【請求項 3】

磁性体の含有量が 1 ~ 20 重量%であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の磁性体内包粒子。

10

【請求項 4】

有機高分子物質は、スチレンに由来するセグメントと、反応性官能基を含有するビニルモノマーに由来するセグメントとを有する共重合体であることを特徴とする請求項 1、2 又は 3 記載の磁性体内包粒子。

【請求項 5】

請求項 1、2、3 又は 4 記載の磁性体内包粒子と、前記磁性体内包粒子に結合又は吸着した抗原又は抗体からなることを特徴とする免疫測定用粒子。

【請求項 6】

請求項 1、2、3 又は 4 記載の磁性体内包粒子を担体として用い、前記磁性体内包粒子の磁性量を標識として分析を行うことを特徴とするイムノクロマトグラフィ法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、クロマト展開性に優れる磁性体内包粒子、免疫測定用粒子及びこれを用いたイムノクロマトグラフィ法に関する。

【背景技術】

【0002】

測定試料中に含有される被検物質を検出する方法としては、例えば、抗原 - 抗体反応を利用した酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、ラテックス凝集法、免疫クロマト法等の、生物学的反応を利用した種々の方法が提案されている。なかでも、簡便かつ迅速であることから、免疫クロマト法が多用されるようになってきている。

30

【0003】

免疫クロマト法では、通常、少なくとも 2 種類の抗体を利用したサンドイッチ法が採用されている。即ち、金属コロイドや着色粒子を担体として、酵素、蛍光物質等で標識された抗体を含む試薬と測定試料とを反応させ、測定試料中に含まれる抗原と標識抗体とを結合し、これをもう一つの抗体が固定化されたクロマト支持体に流すことにより、クロマト支持体中に抗原を補足し、補足された抗原を標識をもとに分析するというものである。

【0004】

このような免疫クロマト法等に供するための担体として、磁性体内包粒子が注目されている。磁性体内包粒子は、もともと、免疫測定法等において磁力により効率よく簡便に B/F 分離を行うための担体としての利用が提案されていたが、磁性体内包粒子の磁性量を標識とすることにより、他の標識物質で標識せずに分析を行うことができる等の利点があるとされる（特許文献 1 ~ 3）。

40

【0005】

しかしながら、実際に磁性体内包粒子を免疫クロマト法に用いると、磁性体内包粒子がクロマト支持体中に滞留してしまったり、展開させる側のクロマト先端部位付近に不均一に残留してしまったりする等、金属コロイドや着色粒子に比べてクロマト展開性が大きく劣るといった問題があった。

50

【0006】

【特許文献1】特開平6-148189号公報

【特許文献2】特開平7-225233号公報

【特許文献3】特表2001-524675号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、上記現状に鑑み、クロマト展開性に優れる磁性体内包粒子、免疫測定用粒子及びこれを用いたイムノクロマトグラフィ法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、有機高分子物質と、前記有機高分子物質中に分散径1~30nmで分散した磁性体とからなる磁性体内包粒子であって、平均粒子径が50~300nm、かつ、0.01Nの塩化ナトリウム水溶液中で測定されるゼータ電位が-10~-50mVである磁性体内包粒子である。

以下に本発明を詳述する。

【0009】

本発明者らは、磁性体内包粒子のクロマト展開性が劣る原因について検討したところ、従来の磁性体内包粒子は自己凝集しやすいことから、二次粒子径が大きくなりクロマト支持体の孔を通過しにくくなること、及び、クロマト支持体自体にも非特異的に吸着しやすいことが原因であることを見出した。更に、鋭意検討の結果、特定の範囲の粒子径を有する磁性体を含むし、平均粒子径が特定の範囲にあり、かつ、ゼータ電位が特定の範囲にある磁性体内包粒子は、自己凝集や非特異的吸着しにくく、クロマト展開性に優れ、イムノクロマトグラフィ法に最適であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0010】

本発明の磁性体内包粒子は、有機高分子物質と、該有機高分子物質中に分散された磁性体とからなる。

上記有機高分子物質は、本発明の磁性体内包粒子のマトリックスとしての役割を有する。上記有機高分子物質としては特に限定されないが、スチレン系モノマーに由来するセグメントと、反応性官能基を含むビニルモノマーに由来するセグメントを含む共重合体であることが好ましい。スチレン系モノマーに由来するセグメントを有することにより、本発明の磁性体内包粒子の水系媒体中における分散性が向上する。また、反応性官能基を含むビニルモノマーに由来するセグメントを有することにより、該反応性官能基を介して抗原や抗体を容易に結合することができる。

【0011】

上記スチレン系モノマーとしては特に限定されず、例えば、スチレン、*m*-メチルスチレン、*p*-メチルスチレン、*p*-クロロスチレン、クロロメチルスチレン等が挙げられる。これらのスチレン系モノマーは単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

上記反応性官能基を含むビニルモノマーの反応性官能基としては、抗原や抗体等を共有結合により結合可能なものであれば特に限定されず、例えば、カルボキシル基、水酸基、エポキシ基、アミノ基、トリエチルアンモニウム基、ジメチルアミノ基、スルホン酸基等が挙げられる。このような反応性官能基を含むビニルモノマーとしては、例えば、(メタ)アクリル酸、(メタ)アクリル酸-2-ヒドロキシエチル、グリシジル(メタ)アクリレート、トリエチルアンモニウム(メタ)アクリレート、ジメチルアミノ(メタ)アクリレート等が挙げられる。これらの反応性官能基を含むビニルモノマーは単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

【0012】

上記共重合体が上記スチレン系モノマーに由来するセグメントを有する場合、その含有量の好ましい下限は80重量%である。80重量%未満であると、得られる本発明の磁性体内包粒子の水系媒体中での分散性が劣ることがある。

10

20

30

40

50

【0013】

上記共重合体は、その他のビニルモノマーに由来するセグメントを有していてもよい。その他のビニルモノマーとしては特に限定されず、例えば、塩化ビニル；酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル等のビニルエステル類；アクリロニトリル等の不飽和ニトリル類；（メタ）アクリル酸メチル、（メタ）アクリル酸エチル、（メタ）アクリル酸ブチル、（メタ）アクリル酸2-エチルヘキシル、（メタ）アクリル酸ステアリル、エチレングリコール（メタ）アクリレート、トリフルオロエチル（メタ）アクリレート、ペンタフルオロプロピル（メタ）アクリレート、シクロヘキシル（メタ）アクリレート、グリシジルメタクリレート、テトラヒドロフルフリル（メタ）アクリレート等の（メタ）アクリル酸エステル誘導体等が挙げられる。これら単量体は単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

10

【0014】

上記共重合体は、架橋性モノマーに由来するセグメントを有していてもよく、これらのセグメントにより架橋が施されていてもよい。上記架橋性モノマーとしては特に限定されず、例えば、ジビニルベンゼン、ジビニルピフェニル、ジビニルナフタレン、エチレングリコールジ（メタ）アクリレート、1,6-ヘキサンジオールジ（メタ）アクリレート、ネオペンチルグリコールジ（メタ）アクリレート、トリメチロールプロパントリ（メタ）アクリレート、テトラメチロールメタントリトリ（メタ）アクリレート、テトラメチロールプロパントトラ（メタ）アクリレート、ジアリルフタレート及びその異性体、トリアリルイソシアヌレート及びその誘導体等が挙げられる。これら架橋性単量体は単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

20

【0015】

上記磁性体は、上記有機高分子物質中に分散されている。上記磁性体としては特に限定されないが、残留磁気がない超常磁性を有するものが好適である。残留磁気があると自己凝集しやすくなり、クロマト展開性が劣ることがある。上記超常磁性を有する磁性体としては特に限定されず、例えば、四三酸化鉄（ Fe_3O_4 ）、 γ -重三二酸化鉄（ $\gamma-Fe_2O_3$ ）等の各種フェライト類；鉄、マンガン、コバルト等の金属又はこれらの合金等が挙げられる。なかでもフェライト類が好適であり、なかでも四三酸化鉄（ Fe_3O_4 ）が好適である。このような磁性体としては、 Fe^{2+} と Fe^{3+} を1：2の割合で含む混合液を塩基性の溶液に滴下することで Fe_3O_4 が得られる共沈反応法により調製したもの等を用いることができる。また、フェリコロイドHC-50（タイホー工業社製）、HX-20（シグマハイケミカル社製）等の市販品を用いることもできる。

30

【0016】

上記有機高分子物質中における磁性体の分散径の下限は1nm、上限は30nmである。1nm未満であると、磁性体の製造自体が困難であることに加え、磁性体の磁性応答特性が減少し、標識として用いたときの感度が低下する。30nmを超えると、残留磁気を生じやすくなり、自己凝集しやすくなることに加え、磁性体が磁性体内包粒子の表面に露出しやすくなる。好ましい下限は5nm、好ましい上限は20nmである。

40

【0017】

本発明の磁性体内包粒子中における磁性体の含有量の好ましい下限は1重量%、好ましい上限は20重量%である。1重量%未満であると、全体としての磁性量が低く、検出感度が低下することがあり、20重量%を超えると、自己凝集しやすくなったり、磁性体内包粒子全体の重量が大きくなり過ぎたりしてクロマト展開性が劣ることがある。より好ましい下限は3重量%、より好ましい上限は15重量%である。

【0018】

本発明の磁性体内包粒子は、平均粒子径の下限が50nm、上限が300nmである。50nm未満であると、媒体中に懸濁させたときの分散安定性が悪くなって自己凝集しやすくなり、300nmを超えると、クロマト支持体の孔を通過しにくくなり、クロマト展開性が劣る。好ましい下限は60nm、好ましい上限は200nmである。

50

【0019】

本発明の磁性体内包粒子は、粒子径のCV値が25%未満であることが好ましい。25%を超えると、粒子径が大きい粒子のクロマト支持体の孔を通過しにくくなり、クロマト支持体中に残存することがある。

【0020】

本発明の磁性体内包粒子は、0.01Nの塩化ナトリウム水溶液中で測定されるゼータ電位が-10~-50mVである。ゼータ電位がプラスであると、抗原を結合又は吸着させる際に凝集したり、クロマト支持体に非特異的に吸着したりすることがある。-50mV未満であると、抗体や抗原等のタンパク質を結合させたり吸着させたりすることが困難となり、標識粒子を作製しづらいことがあり、-10mVを超えると、自己凝集しやすく、クロマト展開性が劣る。好ましくは-20~-40mVである。

10

【0021】

本発明の磁性体内包粒子は、上記有機高分子物質を構成する炭素元素と上記磁性体を構成する金属元素との構成比率の絶対偏差が0.3以下であることが好ましい。

本発明において絶対偏差とは、上記有機高分子物質を構成する炭素元素と、磁性体を構成する金属元素の同期発光を測定し、粒子毎の炭素元素と金属元素との混在比率のバラツキから算出したその測定データの分散状態を示す偏差値であって、磁性体内包粒子の磁性体含有量のバラツキを示すパラメータである。絶対偏差の数値が小さいほど磁性体含有量のバラツキが小さく、即ち磁性体内包粒子の均一性が高く、大きいほど磁性体含有量のバラツキが大きい、即ち磁性体内包粒子の均一性が低いことを示す。

20

絶対偏差が0.3を超えると、免疫測定法に利用した場合に、測定再現性や定量性が低くなり測定精度が悪化することがあり、得られる測定データの信頼性が低くなる。より好ましくは0.27以下であり、更に好ましくは0.25以下であり、特に好ましくは0.20以下である。

【0022】

本発明の磁性体内包粒子を製造する方法としては特に限定されず、例えば、懸濁重合法、マイクロサスペンション重合法、ミニエマルジョン重合法、分散重合法等を応用した方法が挙げられる。なかでも、粒子径の小さな粒子を容易に製造することができることから、ミニエマルジョン重合法を応用した方法が好適である。

以下、ミニエマルジョン重合法による本発明の磁性体内包粒子の製造方法（以下、本実施態様の製造方法ともいう）を詳しく説明する。

30

【0023】

本実施態様の製造方法においては、まず、有機溶剤中に磁性体を均一分散させた磁性体分散液とモノマーと共界面活性剤を混合して磁性体分散モノマー混合液を調製する。このようにして、磁性体を均一分散したモノマー混合液を調製することにより、磁性体が上記有機高分子材料からなるマトリックス中に上述の分散径で微分散し、かつ、上述の絶対偏差の値を達成した磁性体の含有量が均一な磁性体内包粒子を得ることができる。

【0024】

上記磁性体分散液に用いる有機溶媒としては、磁性体の分散性に優れ、磁性体を溶解させず、かつ、モノマーと混合可能なものであれば特に限定されない。

40

このような有機溶媒としては、脂肪族炭化水素系溶媒を含有するものを用いることができる。上記脂肪族炭化水素系溶媒としては、炭素数5~20の直鎖又は分岐のものが好適であり、炭素数5~7の直鎖又は分岐のものがより好適である。具体的には、ペンタン、ヘキサン、ヘプタン、イソブタン、イソペンタン等が挙げられる。これらの脂肪族炭化水素系溶媒は単独でも用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

【0025】

上記有機溶媒の使用量としては、磁性体に対して好ましい下限が1重量%、好ましい上限が500重量%である。1重量%未満であると、十分に磁性体を分散できないことがあり、500重量%を超えると、重合工程後に残存溶媒の除去が必要となり操作が煩雑となることがある。より好ましい下限は10重量%、より好ましい上限は300重量%である。

50

なお、沸点が高い有機溶媒を用いる場合には、より少ない量を用いることが好ましい。

【0026】

上記共界面活性剤としては、ミニエマルジョン重合において一般的に用いられているものであれば特に限定されず、例えば、ヘキサデカン、スクアラン、シクロオクタン等の $C_8 \sim C_{30}$ の直鎖、分岐鎖、環状アルカン類；ステアリルメタクリレート、ドデシルメタクリレート等の $C_8 \sim C_{30}$ アルキルアクリレート；セチルアルコール等の $C_8 \sim C_{30}$ アルキルアルコール；ドデシルメルカプタン等の $C_8 \sim C_{30}$ アルキルチオール；ポリウレタン、ポリエステル、ポリスチレン等のポリマー類；長鎖脂肪族又は芳香族カルボン酸類、長鎖脂肪族又は芳香族カルボン酸エステル類、長鎖脂肪族又は芳香族アミン類、ケトン類、ハロゲン化アルカン類、シラン類、シロキサン類、イソシアネート類等が挙げられる。なかでも、炭素数が12以上のアルカン類が好適であり、なかでも炭素数12～20のアルカン類がより好適である。これらの共界面活性剤は単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

10

上記共界面活性剤の使用量としては、モノマー100重量部に対し好ましい下限は0.1重量部、好ましい上限が50重量部である。

【0027】

本実施態様の製造方法においては、次いで、界面活性剤の共存下で、上記モノマー混合液を水系媒体中に微分散させる。

上記水系媒体としては特に限定されず、通常は蒸留水やイオン交換水等が用いられる。

【0028】

上記界面活性剤としては特に限定されず、アニオン系界面活性剤、カチオン系界面活性剤、ノニオン系界面活性剤のいずれも用いることができる。なかでも、アニオン性界面活性剤が好適である。

20

上記アニオン系界面活性剤としては特に限定されず、例えば、ドデシルベンゼンスルホネート、デシルベンゼンスルホネート、ウンデシルベンゼンスルホネート、トリデシルベンゼンスルホネート、ノニルベンゼンスルホネート並びにこれらのナトリウム、カリウム、アンモニウム塩等が挙げられる。

上記カチオン系界面活性剤としては特に限定されず、セチルトリメチルアンモニウムプロミド、塩化ヘキサデシルピリジニウム、塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム等が挙げられる。

30

上記ノニオン系界面活性剤としては特に限定されず、例えば、ポリビニルアルコール等が挙げられる。また、上記ノニオン系界面活性剤としては、例えば、ユニオンカーバイド社製の「Triton」(X-100、X-114、X-305、N-101)、アイ・シー・アイ社製の「Tween」(20、40、60、80、85)、アイ・シー・アイ社製の「Brij」(35、58、76、98)、シェル社製の「Nonidet」(P-40)、ローヌ・プーラン社製の「Igepol」(CO530、CO630、CO720、CO730)等の市販のものも用いることができる。このうち好ましくはアニオン性界面活性剤である。

【0029】

上記界面活性剤としては、上記モノマーと重合可能な反応基を有する反応性界面活性剤も用いることができる。上記反応基としては、例えば、ビニル基、アリル基、(メタ)アクリロイル基等のエチレン性不飽和基が好適である。

40

このような反応性界面活性剤としては特に限定されず、例えば、特開平9-279073号公報等に記載されるものが挙げられる。具体的には、アニオン性界面活性剤では、例えば、ラウリル(アリルベンゼン)スルホン酸塩、ラウリルスチレンスルホン酸塩、ステアリル(アリルベンゼン)スルホン酸塩、ステアリルスチレンスルホン酸塩等のアルキルベンゼンスルホン酸塩類又はそれらのポリエチレンオキサイド付加物類；ラウリルアリルスルホ琥珀酸エステル、ラウリルビニルスルホ琥珀酸エステル、ステアリルアリルスルホ琥珀酸エステル、ステアリルビニルスルホ琥珀酸エステル等のアルキルスルホ琥珀酸エステル類又はそれらのポリエチレンオキサイド付加物類；(メタ)アクリル酸ラウリルスルホ

50

ン酸塩、オレイルスルホン酸塩等のアルキルまたはアルケニルスルホン酸塩類、(メタ)アクリル酸ステアリル硫酸塩、オレイル硫酸塩等のアルキル又はアルケニル硫酸塩類又はそれらのポリエチレンオキサイド付加物類等が挙げられる。カチオン性界面活性剤では、例えば、ラウリルトリアリルアンモニウムクロライド、ステアリルトリアリルアンモニウムクロライド、ジステアリルジアリルアンモニウムクロライド等の第4級アンモニウム塩類等が挙げられる。ノニオン性界面活性剤では、例えば、ポリエチレングリコールオクチル(アリルフェニル)エーテル、ポリエチレングリコールノニル(アリルフェニル)エーテル、ポリエチレングリコールオレイルフェニルエーテル等のポリエチレングリコールアルキル又はアルケニルフェニルエーテル類；モノステアリル酸モノアリルグリセリル、ジステアリン酸モノアリルグリセリル等のグリセリン脂肪酸エステル類又はそれらのポリエチレンオキサイド付加物類；モノステアリン酸モノアリルソルピタン、トリステアリン酸モノアリルソルピタン等のソルピタン脂肪酸エステル類又はそれらのポリエチレンオキサイド付加物類；ポリエチレングリコールモノ(メタ)アクリレート、ポリエチレングリコールジ(メタ)アクリレート等の(メタ)アクリル酸のポリエチレンオキサイドエステル類等が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0030】

なお、これらの反応性界面活性剤としては、例えば、第一工業製薬社製の「アクアロン HS-10」、日本乳化剤社製の「Antox-MS-60」、「RA-1000シリーズ」、「Antox-MS-2N」、旭電化工業社製の「アデカリアソープ SE-10N」、花王社より「テラムル S-180A」、三洋化成工業社製の「エレミノール JS-2」等(以上、アニオン性界面活性剤)；日本乳化剤社製の「RF 751」等(以上、カチオン性界面活性剤)；旭電化工業社製の「アデカリアソープ NE-10」、日本油脂社製の「プレンマー PE-200」、「プレンマー PE-350」、「プレンマー PE-400」等(以上、ノニオン性界面活性剤)の市販品を用いてもよい。

【0031】

これらの界面活性剤は、単独で用いてもよいし、2種以上を併用してもよい。上記界面活性剤の使用量としては、モノマー100重量部に対し好ましい下限は0.01重量部、好ましい上限が5重量部であり、より好ましい下限は0.1重量部、より好ましい上限は30重量部である。

【0032】

上記モノマー混合液からなる液滴を水系媒体中に微分散させる方法としては特に限定されず、例えば、界面活性剤及び共界面活性剤を含有する水系媒体中に上記モノマー混合液を加え、高いせん断力を発生させるせん断混合装置によって均一に乳化する方法等の従来公知の方法を用いることができる。

上記せん断混合装置としては、例えば、超音波分散機、ピストンホモジナイザー、マイクロ流動化装置(例えば、みずほ工業社製「Microfluidizer」等)が挙げられる。

【0033】

本実施態様の製造方法では、次いで、上記モノマー混合液からなる液滴を重合させて磁性体内包粒子を得る重合工程を行う。上記重合には、適当な重合開始剤を用い、通常50~95で5~24時間程度加熱することにより行う。

【0034】

上記重合開始剤としては、例えば、2,2'-アゾビスイソブチロニトリル、2,2'-アゾビス-(2-メチルプロパンニトリル)、2,2'-アゾビス-(2,4-ジメチルペンタンニトリル)、2,2'-アゾビス-(2-メチルブタンニトリル)、1,1'-アゾビス-(シクロヘキサンカルボニトリル)、2,2'-アゾビス-(2,4-ジメチル-4-メトキシバレロニトリル)、2,2'-アゾビス-(2,4-ジメチルバレロニトリル)、2,2'-アゾビス-(2-アミジノプロパン)ヒドロクロリド等のアゾ(アゾビスニトリル)タイプの開始剤、過酸化ベンゾイル、クメンヒドロペルオキシド、過酸化水素、過酸化アセチル、過酸化ラウロイル、過硫酸塩(例えば過硫酸アンモニウ

ム)、過酸エステル(例えばt-ブチルペルオクテート、t-クミルペルオキシピバレート及びt-ブチルペルオクテート)等の過酸化物タイプのラジカル系重合開始剤等が挙げられる。

これらの重合開始剤は、モノマー混合物液滴の分散液の調製時に添加してもよいし、調整後に別に添加してもよい。

上記重合開始剤の使用量としては、モノマーに対して好ましい下限は0.1重量%、好ましい上限は30重量%である。

【0035】

このようにして得られた磁性体内包粒子は、透析法、遠心分離法、イオン交換樹脂による方法等の従来公知の精製方法により精製した後、用いることができる。

10

【0036】

本発明の磁性体内包粒子は、平均粒子径が50~300nmであり、かつ、自己凝集しないことから、通常孔径が5~20 μ mであるクロマト支持体中を容易に展開(移動)することができる。また、クロマト支持体に非特異的に吸着することもない。従って、クロマト展開性に極めて優れる。従って、本発明の磁性体内包粒子を担体として、抗原や抗体等を結合又は吸着した免疫測定用粒子を用いれば、磁性体内包粒子の磁性量を標識として分析を行うイムノクロマトグラフィ法に好適に用いることができる。

本発明の磁性体内包粒子と、上記磁性体内包粒子に結合又は吸着した抗原又は抗体からなる免疫測定用粒子もまた、本発明の1つである。

本発明の磁性体内包粒子を担体として用い、上記磁性体内包粒子の磁性量を標識として分析を行うイムノクロマトグラフィ法もまた、本発明の1つである。

20

【発明の効果】

【0037】

本発明によれば、クロマト展開性に優れる磁性体内包粒子、免疫測定用粒子及びこれを用いたイムノクロマトグラフィ法を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0038】

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

【0039】

30

(実施例1)

(1)磁性体内包粒子の作製

タイホー工業社製の磁性流体「フェリコロイドHC50」6g(磁性体3g含有)を真空乾燥機中で100 $^{\circ}$ Cにて24時間乾燥し、磁性流体4.2gを得た。得られた磁性流体にヘキサン3gを入れ、一晚放置し、磁性体を分散させて磁性体分散液を得た。

得られた磁性体分散液の全量に対して、スチレン10g、ヘキサデカン0.8g及び2,2'-アゾビスイソブチロニトリル0.05gを加え、超音波ホモジナイザーを用いて氷冷下で処理してモノマー混合液を得た。

【0040】

一方、水100gにドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム0.8g及び過硫酸カリウム0.05gを溶解させた後、得られたモノマー混合液を加え、超音波ホモジナイザーを用いて、氷冷下で10分間処理して、磁性体を含むモノマー混合液の液滴が水中に分散したミニエマルジョン溶液を調製した。

40

得られたミニエマルジョン溶液を窒素雰囲気下、80 $^{\circ}$ Cで、24時間重合することにより、磁性体内包粒子を得た。

得られた粒子は、遠心分離・再分散を蒸留水で3回繰り返し行うことで精製した。この際、遠心分離は2000、15000rpmで行った。遠心分離を行った後、上澄みをデカンテーションにより捨て、蒸留水を加え、ボルテックスにより再分散を行って磁性体内包粒子を得た。

【0041】

50

得られた磁性体内包粒子について、動的光散乱法により粒子径を測定したところ、平均粒子径は90nmであった。また、ゼータ電位測定装置(日本ルフト社製)を用いて0.01N塩化ナトリウム水溶液中に磁性体内包粒子を分散し、15分間超音波処理後、20にてゼータ電位を測定したところ-36であった。

また、TG-DTA分析により磁性体内包粒子中の磁性体含有率を測定したところ27%であった。

更に、FE-TEM分析により磁性体内包粒子を分析したところ、含有される磁性体は全て粒子の内部に存在しており粒子表面には露出していないことが確認できた。

【0042】

(2) 免疫測定用粒子の調製

得られた磁性体内包粒子12.5mgにpH9.5の水酸化カリウム水溶液1mLを加え、15000RPMにて10分間遠心分離後、上清を除去し、分散液に添加されている界面活性剤を除去した。続いて、得られた沈渣に、0.1Mホウ酸バッファ-1.2mLを添加し、抗-hCGモノクローナル抗体200μg加え、37℃恒温槽中で1時間攪拌した。その後、15000RPMにて10分間遠心分離を行い、未反応の抗-hCGモノクローナル抗体を除去した。なお、粒子への抗-hCGモノクローナル抗体結合量は、上清の蛋白濃度測定から仕込みの83%であることを確認した。

【0043】

得られた沈渣を100mMリン酸緩衝液(pH6.5)1mLに懸濁させ、再度遠心分離を行った。得られた沈渣を、牛血清アルブミンが1%(w/v)濃度になるように調整した100mMリン酸緩衝液(pH6.5)1mLに懸濁させ、37℃恒温槽で30分間攪拌し、ブロッキング処理を行った。その後、15000RPMにて10分間遠心分離を行い、その沈渣を牛血清アルブミン及びグリセロールを各々5%(w/v)、アジ化ナトリウムを0.01%(w/v)濃度になるように調整した100mMリン酸緩衝液(pH7.5)1mLに分散させ、免疫測定用粒子を得た。

【0044】

(比較例1)

市販の磁性体内包粒子(メルク社製、エスタポールM1030/40)0.6mgにpH9.5の水酸化カリウム水溶液1mLを加え、15000RPMにて10分間遠心分離後、上清を除去し、分散液に添加されている界面活性剤を除去した。続いて、得られた沈渣に、0.02Mリン酸バッファ-を625μL、予め調整した2%濃度のカルボジイミド溶液(PBSバッファ-)を0.625mL添加し、37℃恒温槽中で1.5時間攪拌した。反応溶液は、15000RPMにて10分間遠心分離を行い、上清を除去後、0.02Mリン酸バッファ-1.2mLを添加し、超音波で再分散した。この遠心洗浄操作を3回繰り返し、未反応のカルボジイミドを除去した。

【0045】

続いて、得られた沈渣に、0.1Mホウ酸バッファ-1.2mLを添加し、抗-hCGモノクローナル抗体200μg加え、37℃恒温槽中で一晩攪拌した。翌日、反応溶液に30mMグリシン溶液(ホウ酸バッファ-)50μLを添加し、37℃恒温槽中で30分間攪拌した。その後、15000RPMにて10分間遠心分離を行い、未反応の抗-hCGモノクローナル抗体を除去した。なお、粒子への抗-hCGモノクローナル抗体結合量は、上清の蛋白濃度測定から仕込みの63%であることを確認した。

【0046】

得られた沈渣を100mMリン酸緩衝液(pH6.5)1mLに懸濁させ、再度遠心分離を行った。得られた沈渣を、牛血清アルブミンが1%(w/v)濃度になるように調整した100mMリン酸緩衝液(pH6.5)1mLに懸濁させ、37℃恒温槽で30分間攪拌し、ブロッキング処理を行った。その後、15000RPMにて10分間遠心分離を行い、その沈渣を牛血清アルブミン及びグリセロールを各々5%(w/v)、アジ化ナトリウムを0.01%(w/v)濃度になるように調整した100mMリン酸緩衝液(pH7.5)1mLに分散させ、免疫測定用粒子を得た。

10

20

30

40

50

【0047】

(評価)

実施例1及び比較例1で得られた免疫測定用粒子について、以下の方法により評価を行った。

【0048】

(1)クロマト展開性の評価

免疫測定用粒子を固形分0.045%(w/w)になるように、牛血清アルブミン1%(w/v)及びトリトン-100 0.03%(w/v)濃度になるように調整した生理食塩水に分散した分散液を調製した。

各々の分散液30 μ Lをポアサイズ10~12 μ mのニトロセルロースメンブレン(SRHFP70、日本ミリポア社製)にスポットし、円形状に分散液を展開させた。分散液の展開は、いずれも直径約18mmの円状であった。その後、乾燥させ、磁性体内包粒子の展開により着色形成された円形の直径を計測し、また、着色の状況を目視にて観察した。

【0049】

実施例1で作製した免疫測定用粒子を用いた場合の円形の直径は17mmであり、着色は円形全体にほぼ均一であった。

これに対して、比較例1で作製した免疫測定用粒子を用いた場合の円形の直径は12mmであり、スポット中心部付近の着色が濃く周辺部の着色が薄い不均一な展開であった。

【0050】

(2)免疫測定の実施

ニトロセルロースメンブレン(SRHFP70、日本ミリポア社製)を幅20cm×長さ6cmに裁断し、その長さ方向上端より3cmの部位(反応部位)に、抗-hCGモノクローナル抗体を2.0mg/mlの濃度になるようにトリス塩酸緩衝液(10mmol/l、pH7.4)に溶解した溶液を幅0.7mmの直線状に塗布した。その後、37℃で2時間乾燥した後、牛血清アルブミン(和光純薬社製)を1重量%の濃度になるようにリン酸緩衝液(100mmol/l、pH7.5)に溶解した溶液に1時間浸漬し、ブロッキング処理を行った。さらにその後、ラウリルベンゼンスルホン酸ナトリウムを0.1重量%の濃度になるようにリン酸緩衝液(100mmol/l、pH7.5)に溶解した溶液にて洗浄後、シリカゲルデシケーター内で室温下にて乾燥し、抗-hCGモノクローナル抗体を固定化した試験片を得た。

【0051】

得られた試験片を幅5mmに裁断し、長さ方向上端に幅5mm×長さ20mmの吸水パッド(AP22 日本ミリポア社製)を、下端に幅5mm×長さ15mmのコンジュゲートパッド(グラスファイバー 日本ミリポア社製)を重ね、透明なテープで固定して試験片とした。

【0052】

免疫測定用粒子を0.05%(w/w)の濃度になるように、牛血清アルブミン1%(w/v)、トリトン-100 0.03%(w/v)、及び、hCGが0mIU/mL、25mIU/mL、100mIU/mL、1000mIU/mL、5000mIU/mL濃度になるように試験液を調整した生理食塩水に分散した。

次いで、作製した試験片のコンジュゲートパッドにhCGが所定濃度の試験液100 μ Lをそれぞれ滴下した。

【0053】

実施例1で作製した免疫測定用粒子を用いた場合では、滴下10分後、hCGが0mIU/mLを除いた全ての試験片において、反応部位に免疫測定用粒子に基づく着色が認められた。また、その着色度合いは、hCG濃度に依存していることが確認された。これにより、磁性を標識とする免疫測定法に有用であることが示された。

一方、比較例1で作製した免疫測定用粒子を用いた場合では、いずれの試験片でも反応部位及び反応部位までの部位で免疫測定用粒子に基づく着色が認められた。特に、コンジュ

10

20

30

40

50

ゲートパッドを重ねた部位付近の着色が強く、免疫測定用粒子が滞留していることが認められ、hCGが1000 mIU/mL以上では、その部位は反応部位よりも強く着色していることが認められた。従って、比較例1で作製した免疫測定用粒子では、試験片に免疫測定用粒子が滞留し、被検物質濃度に応じて展開する免疫測定用粒子量の変動し、更に、被検物質が存在しなくても(hCG: 0 mIU/mL)非特異的に反応部位に免疫測定用粒子が補足されてしまうことが判った。

【産業上の利用可能性】

【0054】

本発明によれば、クロマト展開性に優れる磁性体内包粒子、免疫測定用粒子及びこれを用いたイムノクロマトグラフィ法を提供することができる。