

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2007年2月8日 (08.02.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/015377 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/566 (2006.01)
G01N 33/553 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/314378
- (22) 国際出願日: 2006年7月20日 (20.07.2006)
- (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2005-226381 2005年8月4日 (04.08.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP). 警察庁科学警察研究所長が代表する日本国 (JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR GENERAL OF NATIONAL RESEARCH INSTITUTE OF POLICE SCIENCE, NATIONAL POLICE AGENCY) [JP/JP]; 〒2770882 千葉県柏市柏の葉6丁目3番地1 Chiba (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大賀 幸二 (OHGA, Koji) [JP/JP]; 〒3058565 茨城県つくば市東1-1-1 中央第5 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 鶴沢 浩隆 (UZAWA, Hiroataka) [JP/JP]; 〒3058565 茨城県つくば市東1-1-1 中央第5 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 瀬戸 康雄 (SETO, Yasuo) [JP/JP]; 〒2770882 千葉県柏市柏の葉6丁目

3番地1 警察庁科学警察研究所内 Chiba (JP). 大沢 勇久 (OHSAWA, Hayahisa) [JP/JP]; 〒2770882 千葉県柏市柏の葉6丁目3番地1 警察庁科学警察研究所内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (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, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, 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, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

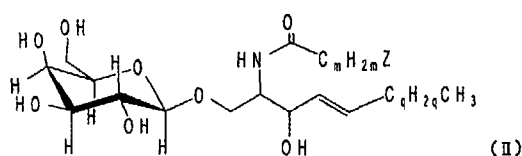
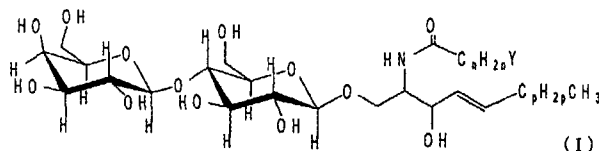
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

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: METHOD OF DETECTING RICIN, KIT AND SENSOR CHIP FOR DETECTING RICIN

(54) 発明の名称: リシンの検出方法、リシン検出用キットおよびセンサーチップ



(57) Abstract: A method of detecting ricin comprising the steps of (1) detecting a test compound by bringing the test compound into contact with a detection substrate 1 on which a compound represented by the general formula (I) is immobilized; (I) (2) detecting the test compound by bringing the test compound into contact with a detection substrate 2 on which a compound represented by the general formula (II) is immobilized; (II) (3) (a) assuming that when the compound is not detected in the detection step 1, ricin 60 is not contained in the test compound; (b) assuming that when the compound is detected in the detection step 1 and is not detected in the detection step 2, ricin 60 is contained in the test compound; and (c) assuming that when the compound is detected in both detection steps 1 and 2, ricin

120 is contained in the test compound.

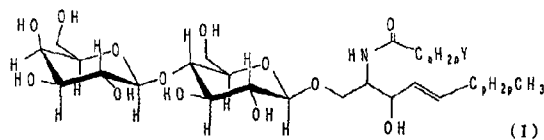
/ 続葉有 /

WO 2007/015377 A1

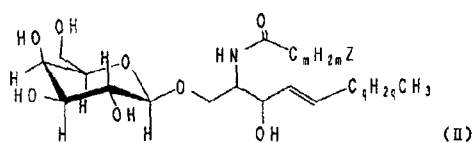


(57) 要約:

(1) 一般式 (I) で表される化合物が固定されている検出基材 1 に試験化合物を接触させ検出する工程；



(2) 一般式 (II) で表される化合物が固定されている検出基材 2 に試験化合物を接触させ検出する工程；



(3) (a) 検出工程 1 において化合物が検出されない場合、試験化合物にリシン 60 が含有されていないと推定し； (b) 検出工程 1 において化合物が検出され、検出工程 2 において化合物が検出されない場合、試験化合物にリシン 60 が含有されていると推定し； (c) 検出工程 1 および検出工程 2 のいずれにおいても化合物が検出される場合、試験化合物にリシン 120 が含有されていると推定する工程を含むリシンの検出方法。

明 細 書

リシンの検出方法、リシン検出用キットおよびセンサーチップ

技術分野

- [0001] 本発明は、リシンの検出方法、リシン検出用キット、リシン検出用センサーチップに関する。より詳しくは、リシン60とリシン120とを区別してリシンを検出する方法、キット、センサーチップに関する。

背景技術

- [0002] 植物由来のタンパク性毒素であるリシンは、トウゴマ(ヒマ: *Ricinus communis*)の種子から抽出され、2種の構造的に関連した蛋白質の混合物として得られる。一つは分子量が60kDaのリシン60、他の一つはリシン60とホモロジーが高度に類似(アミノ酸配列のホモロジーが約90%)した極めて類似なタンパク質の2量体である分子量120kDaのリシン120である。
- [0003] 分子量60kDaのリシン(リシン60)の場合、A鎖(分子量28kDa)とB鎖(分子量32kDa)の2つのサブユニットで構成され、両者は、ジスルフィド結合(—S—S—結合)でつながっている。B鎖は、細胞表面のオリゴ糖に結合し、—S—S—結合を還元した後、エンドサイトーシスによって、A鎖を細胞の中に取り込む。A鎖は、28SリボソームRNAに作用し、A₄₃₂₄を加水分解することで、タンパク質の生合成を阻害し、細胞を死滅させる。このような性質を持つリシン60は、3～5 μ g/kg(吸引)投与量で死に至らしめる強力な毒素であり、その原料であるトウゴマは温帯地域に広く分布していて比較的入手しやすく、リシン60を生産することも容易である。また、リシン60は安定したエアロゾルが可能であり、中毒症状に対する治療法や予防ワクチンも十分に存在しないことから、潜在的な生物化学兵器の構成要素となる危険性もある。リシン60は、現在化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律において特定物質に指定されており、その製造、所持、使用は規制されている。
- [0004] このため、リシン60の検出方法の確立が近年重要になってきている。これまで、リシン60の検出方法としては、たとえば抗原抗体法が挙げられる。そのうちで、免疫クロマトグラフィー法を原理とした免疫ストリップは現場使用用に市販されており、15分程

度のマニュアル操作で、現場試料から検出することが可能であるが、検出感度は高いものではなく、概ね100ng/mlである(非特許文献1)。さらに、抗原抗体法の場合、使用する抗体は蛋白質であり変性を受ける可能性があるために、低温での管理が必要であったり、また室温保管が可能であっても保証有効期限が短いなどの課題がある。特に、温度管理が困難であったり、長期の使用を余儀なくされる地域においては、より簡便でどこでも使用できる検出方法の開発が望まれていた。

[0005] また、通常、リシン60等の検出においては、一つの方法のみによるのではなく、必要に応じ複数の検出方法を組み合わせることにより、検出確度を向上させる。このため、抗原抗体法に加え、さらに有効な検出方法の確立も望まれていた。

[0006] 一方、上述のとおり、リシン毒素にはリシン60とリシン120の2種類存在するが、これらは分子量が大きく異なるものの、同一原料から得られ、しかも、タンパク質のホモロジーが極めて高く、これらが混在した場合には、猛毒であるリシン60が含まれるか否かを短時間で正確に検出する有効な方法がこれまで存在していなかった。

[0007] ところで、これまで天然の糖脂質を何ら修飾することなく、ラクトースセラミドおよびガラクトースセラミド等を用いたリポソームによるリシン60の検出に関する報告されている(非特許文献2)。ここでは、ラクトースセラミドおよびガラクトースセラミドのいずれでもリシン60の検出ができたことが記載されているが、これら両化合物の検出感度は低く、また感度は同程度であり、リシン120の検出についての記載はない。

[0008] また、別の報告では、糖脂質を用いたリポソームによる表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance: SPR)を用いたリシン60の計測の報告がなされている(非特許文献3)。しかしこの報告では、測定感度が低く、またラクトースセラミドおよびガラクトースセラミドを用いた場合には、リシン60とのインターアクションが観測されないか、または極めて低いと記載されている。また、リシン120の検出についての記載はない。

非特許文献1: Japanese Journal of Forensic Toxicology, Vol. 22, 13-16, 2004

非特許文献2: Analytical Chemistry, Vol. 73, 72-79, January 1, 2001

非特許文献3: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 30 (2003) 13-24

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、特定の糖化合物を用いて、簡便かつ迅速に高い検出感度でリシンを検出する方法を提供することを課題とする。特に、リシン60と極めて類似なタンパク質の2量体であるリシン120との混合物においても、これらを区別して簡便かつ迅速にリシンを検出できる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

[0010] 本発明者らは、上記課題を鑑み鋭意研究の結果、ラクトース型の糖鎖部位を有するセラミド化合物(ラクトース含有化合物)、ガラクトース型の糖鎖部位を有するセラミド化合物(ガラクトース含有化合物)を、それぞれ、金属基板や金属微粒子等の基材に固定化すると、高度な配向性で高密度に固定を行うことができることを見出した。

さらに、(1)ラクトース含有セラミド化合物を含有する基材をセンサーあるいは検出試薬等として用いると、極微量のリシン60およびリシン120を高感度で迅速に検出・定量でき、(2)ガラクトース含有セラミド化合物を含有する基材をセンサーあるいは検出試薬等として用いると、極微量のリシン120のみを高感度で迅速に検出・定量することができることを見出した。(1)および(2)の結果により、猛毒のリシン60のみを選択的に、高感度で迅速に検出・定量・判定することができることを見出し、本発明を完成した。

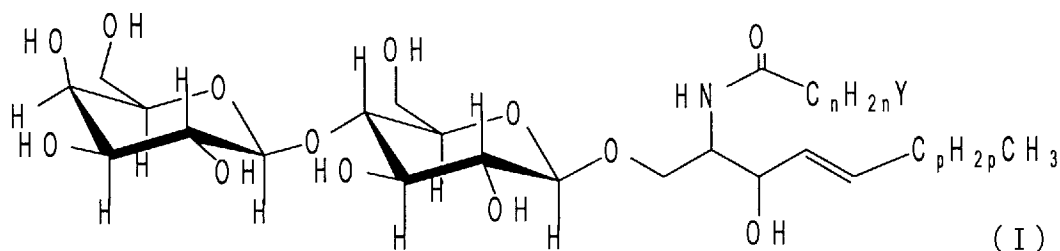
[0011] すなわち本件発明は以下を含む。

[1]

下記の検出工程1、検出工程2および認定工程を含む、リシンの検出方法；

(1)検出工程1:

下記一般式(I)

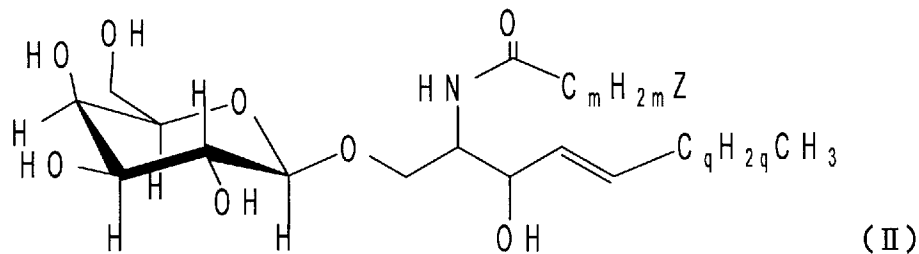


[式中、nは2～20の整数を示し、Yは1個又は2個以上のチオール基または1個又は2個以上ジスルフィド基を有する基を示し；側鎖部位中のpは1～17の整数を示す。]

で表されるラクトース含有化合物が、Yを介して基材1の表面に固定されている検出基材1の表面に、試験化合物を接触させ、検出基材1に結合した化合物を検出する工程、

(2)検出工程2:

下記一般式(II)



[式中、mは2～20の整数を示し、Zは1個又は2個以上のチオール基または1個又は2個以上ジスルフィド基を有する基を示し；側鎖部位中のqは1～17の整数を示す。]で表されるガラクトース含有化合物が、Zを介して基材2の表面に固定されている検出基材2の表面に、前記検出工程1で用いたのと同じ試験化合物を接触させ、検出基材2に結合した化合物を検出する工程、

(3)推定工程:

- (a)前記検出工程1において、検出基材1の表面に結合した化合物が実質的に検出されない場合、試験化合物にリシン60が含有されていないと推定し；
- (b)前記検出工程1において、検出基材1の表面に結合した化合物が実質的に検出され、前記検出工程2において、検出基材2の表面に結合した化合物が実質的に検出されない場合に、試験化合物にリシン60が含有されていると推定し；
- (c)前記検出工程1および検出工程2において、検出基材1および2のいずれにおいても表面に結合した化合物が実質的に検出される場合、試験化合物にリシン120が含有されていると推定する。

[2]

検出工程1および／または検出工程2の前に、さらに試験化合物を分離精製する分離工程を含む、[1]に記載の方法。

[3]

前記(3)推定工程において、(c)前記検出工程1および検出工程2において、検出基材1および2のいずれにおいても表面に結合した化合物が実質的に検出される場合、さらに前記分離工程を行い、該分離工程を経て得られた各化合物それぞれについて前記検出工程1および／または検出工程2を行う、〔2〕に記載の方法。

〔4〕

前記分離精製した各化合物について、検出工程後の推定工程(3')が下記のとおりである、〔2〕または〔3〕に記載の方法；

(a')前記検出工程1において、検出基材1の表面に結合した化合物が実質的に検出されない場合、該化合物はリシン60ではないと推定し；

(b')前記検出工程1において、検出基材1の表面に結合した化合物が実質的に検出され、前記検出工程2において、検出基材2の表面に結合した化合物が実質的に検出されない場合、該化合物はリシン60であると推定し；

(c')前記検出工程1および検出工程2において、検出基材1および2のいずれにおいても表面に結合した化合物が実質的に検出される場合、該化合物はリシン60ではないと推定する。

〔5〕

前記基材1および2がそれぞれ金属基板1および2であり、前記ラクトース含有化合物が金属基板1に固定された検出基材1がセンサーチップ1、前記ガラクトース含有化合物が金属基板2に固定された検出基材2がセンサーチップ2である、〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の方法。

〔6〕

前記ラクトース含有化合物および前記ガラクトース含有化合物が、それぞれ金属基板1および2に固定されたときの密度が $0.1 \sim 10$ 個/ nm^2 である、〔5〕に記載の方法。

〔7〕

前記金属基板1および2が、金基板である、〔5〕または〔6〕に記載の方法。

〔8〕

前記センサーチップがSPRセンサー用である、〔5〕～〔7〕のいずれかに記載の方

法。

[9]

前記基材1および2がそれぞれ微粒子1および2であり、前記ラクトース含有化合物が該微粒子1に固定されたリシン検出用微粒子1、および前記ガラクトース含有化合物が該微粒子2に固定されたリシン検出用微粒子2が、それぞれ溶液中にコロイドで存在している、[1]～[4]のいずれかに記載の方法。

[10]

前記微粒子1および2の平均粒子径が、1～100nmの範囲にある、[9]に記載の方法。

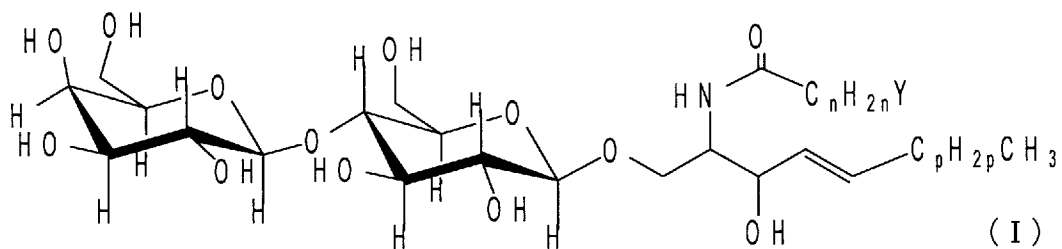
[11]

前記微粒子1および2が、金属微粒子または半導体微粒子である、[9]または[10]に記載の方法。

[12]

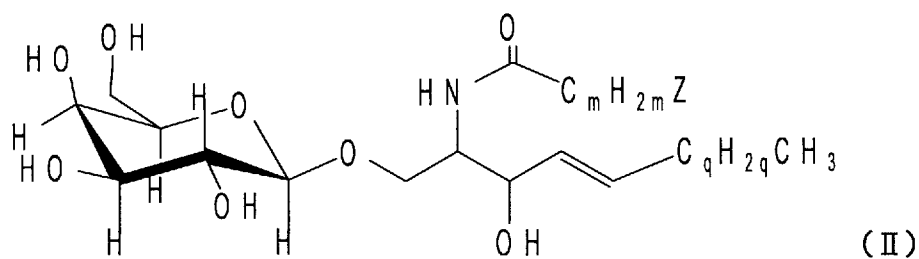
下記検出基材1および下記検出基材2を含む、リシン検出用基材；

(1) 下記一般式(I)



[式中、nは2～20の整数を示し、Yは1個又は2個以上のチオール基または1個又は2個以上ジスルフィド基を有する基を示し；側鎖部位中のpは1～17の整数を示す。]
で表されるラクトース含有化合物が、Yを介して基材1の表面に固定された、検出基材1：

(2) 下記一般式(II)

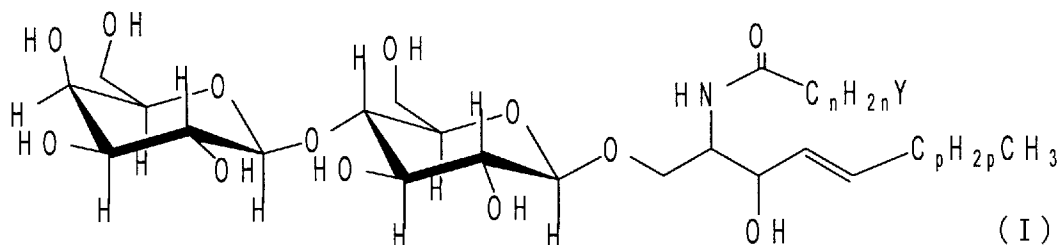


[式中、 m は2～20の整数を示し、 Z は1個又は2個以上のチオール基または1個又は2個以上ジスルフィド基を有する基を示し；側鎖部位中の q は1～17の整数を示す。]で表されるガラクトース含有化合物が、 Z を介して基材2の表面に固定された、検出基材2。

[13]

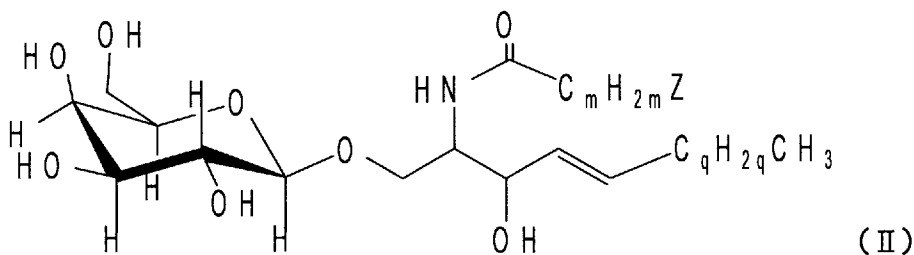
下記のセンサーチップ1およびセンサーチップ2を含む、リシン検出用センサーチップ；

(1) 下記一般式(I)



[式中、 n は2～20の整数を示し、 Y は1個又は2個以上のチオール基または1個又は2個以上ジスルフィド基を有する基を示し；側鎖部位中の p は1～17の整数を示す。]で表されるラクトース含有化合物が、 Y を介して金属基板1の表面に固定された、センサーチップ1；

(2) 下記一般式(II)



[式中、 m は2～20の整数を示し、 Z は1個又は2個以上のチオール基または1個又は

は2個以上ジスルフィド基を有する基を示し;側鎖部位中のqは1~17の整数を示す。]で表されるガラクトース含有化合物が、Zを介して金属基板2の表面に固定された、センサーチップ2。

[14]

前記ラクトース含有化合物と前記ガラクトース含有化合物とが、同一の金属基板表面に固定されている、[13]に記載のセンサーチップ。

[15]

前記ラクトース含有化合物および前記ガラクトース含有化合物が、それぞれ金属基板1および2に固定されたときの密度が0.1~10個/nm²である、[13]または[14]に記載のセンサーチップ。

[16]

前記金属基板1および2が、金基板である、[13]~[15]のいずれかに記載のセンサーチップ。

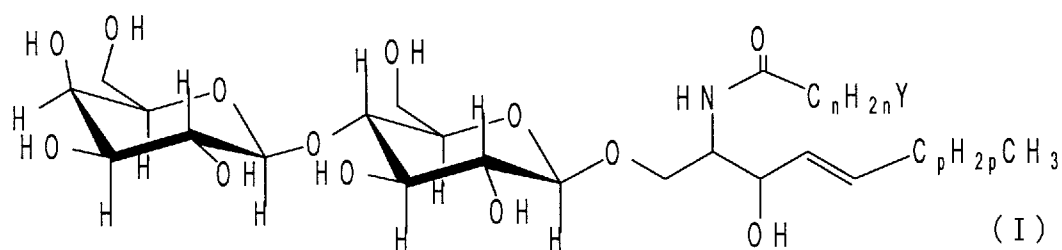
[17]

前記センサーチップがSPRセンサー用である、[13]~[16]のいずれかに記載のセンサーチップ。

[18]

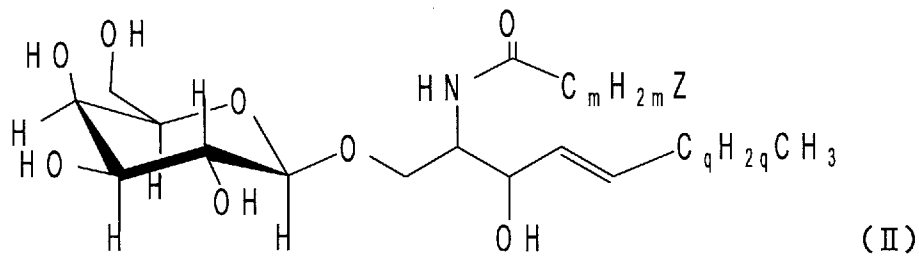
下記検出試薬1および下記検出試薬2を含む、リシン検出用キット;

(1) 下記一般式(I)



[式中、nは2~20の整数を示し、Yは1個又は2個以上のチオール基または1個又は2個以上ジスルフィド基を有する基を示し;側鎖部位中のpは1~17の整数を示す。]で表されるラクトース含有化合物が、Yを介して微粒子1の表面に固定された、リシン検出用微粒子1を含有する検出試薬1:

(2) 下記一般式(II):



[式中、 m は2～20の整数を示し、 Z は1個又は2個以上のチオール基または1個又は2個以上ジスルフィド基を有する基を示し；側鎖部位中の q は1～17の整数を示す。]で表されるガラクトース含有化合物が、 Z を介して微粒子2の表面に固定された、リシン検出用微粒子2を含有する検出試薬2。

[19]

前記検出試薬1および検出試薬2において、前記リシン検出用微粒子1およびリシン検出用微粒子2がそれぞれ溶液中にコロイドで存在している、[18]に記載のキット。

[20]

前記微粒子1および2の平均粒子径が、1～100nmの範囲にある、[18]または[19]に記載のキット。

[21]

前記微粒子1および2が金属微粒子または半導体微粒子である、[18]～[20]のいずれかに記載のキット。

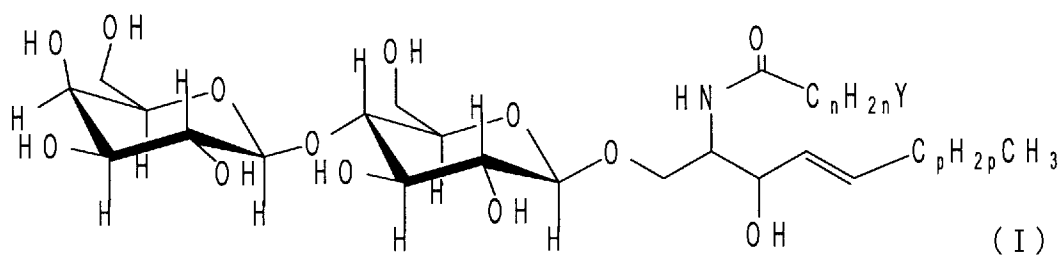
[0012] <リシンの検出方法>

本発明に係るリシンの検出方法は、下記の検出工程1、検出工程2および認定工程を含む。

[0013] 下記の検出工程1、検出工程2および認定工程を含む、リシンの検出方法；

(1)検出工程1:

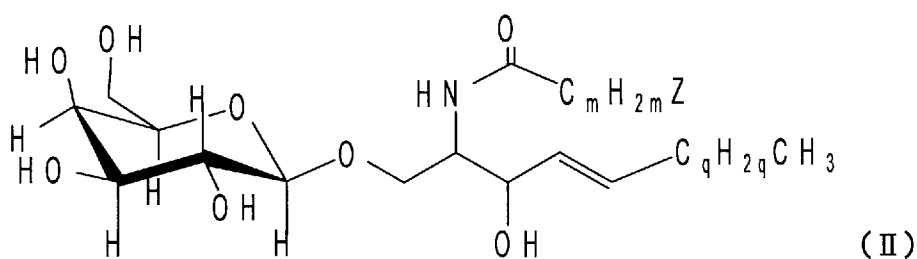
下記一般式(I)



[式中、nは2～20の整数を示し、Yは1個又は2個以上のチオール基または1個又は2個以上ジスルフィド基を有する基を示し；側鎖部位中のpは1～17の整数を示す。]
で表されるラクトース含有化合物が、Yを介して基材1の表面に固定されている検出
基材1の表面に、試験化合物を接触させ、検出基材1に結合した化合物を検出する
工程、

(2) 検出工程2:

下記一般式(II)



[式中、mは2～20の整数を示し、Zは1個又は2個以上のチオール基または1個又は2個以上ジスルフィド基を有する基を示し；側鎖部位中のqは1～17の整数を示す。]
で表されるガラクトース含有化合物が、Zを介して基材2の表面に固定されている
検出基材2の表面に、前記検出工程1で用いたのと同じ試験化合物を接触させ、
検出基材2に結合した化合物を検出する工程、

(3) 推定工程:

- (a) 前記検出工程1において、検出基材1の表面に結合した化合物が実質的に検出されない場合、試験化合物にリシン60が含有されていないと推定し；
- (b) 前記検出工程1において、検出基材1の表面に結合した化合物が実質的に検出され、前記検出工程2において、検出基材2の表面に結合した化合物が実質的に検出されない場合に、試験化合物にリシン60が含有されていると推定し；
- (c) 前記検出工程1および検出工程2において、検出基材1および2のいずれにおい

ても表面に結合した化合物が実質的に検出される場合、試験化合物にリシン120が含有されていると推定する。

[0014] すなわち、本発明で用いるラクトース含有化合物が固定された検出基材1は、リシン60およびリシン120に対する結合能が極めて高く、本発明で用いるガラクトース含有化合物が固定された検出基材2はリシン120に対してのみ結合能が極めて高い。

このため、前記推定工程(a)に該当する場合は、検出基材1の表面に結合した化合物が実質的に検出されない場合、試験化合物にリシン60が含有されていないと推定できる。

また、前記推定工程(b)に該当する場合は、前記検出工程1において、基材1の表面に結合した化合物が実質的に検出され、前記検出工程2において、基材2の表面に結合した化合物が実質的に検出されない場合に、試験化合物にリシン60が含有されていると推定することができる。

さらに、前記推定工程(c)に該当する場合は、前記検出工程1および検出工程2において、検出基材1および2のいずれにおいても表面に結合した化合物が実質的に検出される場合、試験化合物にリシン120が含有されていると推定することができる。

[0015] ここで、前記推定工程(c)に該当する場合、リシン120の存在を推定できるが、リシン120が存在する場合にさらにリシン60が混入しているか否かは判定できない。しかし、リシン120はリシン60に類似したタンパク質の2量体で、それぞれ分子量が120kDa、60kDaと著しく異なるため、分子量10万程度の分画フィルターなどによる除去や、分子ふるいによる分離を行なうことによって、これらを容易に短時間で分離精製することができる。したがって、推定工程(c)に該当する場合は、試験化合物を分離工程に供し、リシン60が含有されている場合でもリシン120とリシン60とを分離精製し、分離した化合物それぞれについて、再び、検出工程1および／または検出工程2を実施すればよい。あるいは、予め、試験化合物を分離精製して、各化合物について、上記検出工程1および検出工程2を実施してもよい。

[0016] このような分離工程を行って、各化合物について検出工程を行う場合、下記(a')、(b')、(c')の推定工程(3')に従って、各化合物がリシン60と推定できるのか、リシン120と推定できるのかを判断できる。

[0017] 推定工程(3')

(a')前記検出工程1において、検出基材1の表面に結合した化合物が実質的に検出されない場合、該化合物はリシン60ではないと推定する。

(b')前記検出工程1において、検出基材1の表面に結合した化合物が実質的に検出され、前記検出工程2において、検出基材2の表面に結合した化合物が実質的に検出されない場合、該化合物はリシン60であると推定することができる。

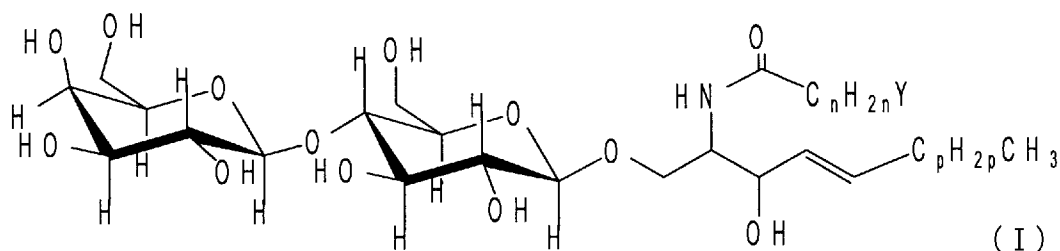
(c') 前記検出工程1および検出工程2において、検出基材1および2のいずれにおいても表面に結合した化合物が実質的に検出される場合、該化合物はリシン60ではないと推定することができる。

[0018] 本明細書において「実質的に検出」とは、ノイズ程度の検出を除くことを意味する。

[0019] 本明細書において「リシン60」とは、トウゴマ(ヒマ:Ricinus communis)の種子から抽出されるタンパク質であり、分子量が60kDaで、A鎖(分子量28kDa)とB鎖(分子量32kDa)の2つのサブユニットで構成され、—S—S—結合でつながっている化合物である。「リシン120」はリシン60とホモロジーが極めて類似なタンパク質の2量体であり、トウゴマからリシン60とともに抽出される。なお、本明細書において、「リシン60」および「リシン120」を、まとめて「リシン」という。

[0020] <ラクトース含有化合物>

前記ラクトース含有化合物は、下記一般式(I)で表される。



[0021] 式中、nは2～20の整数を示し、好ましくは2～10、さらに好ましくは3～8、特に好ましくは3～5である。前記pは、好ましくは1～17の整数を示し、より好ましくは7～17、さらに好ましくは10～15である。

[0022] このような式(I)で表されるように、リンカー部位($-\text{COC}_n\text{H}_{2n}\text{Y}$)と側鎖部位($-\text{CH}(\text{OH})\text{C}=\text{CC}_p\text{H}_{2p}\text{CH}_3$)とを有すると、ラクトース含有化合物をセンサーに適した配向

性で高密度に基板や微粒子に固定することができるとともに、ラクトース含有化合物を含有するバイオセンサー、あるいはラクトース含有化合物が固定された微粒子を含有する検出試薬を用いると、極微量のリシン60およびリシン120でも高感度に検出・定量できる。

[0023] 特に、式(I)において、nが上記範囲にあると、ラクトース含有化合物を、基板表面あるいは微粒子表面に結合したときのセンサーの感度が向上するとともに、リシン60およびリシン120との結合に適した密度・配向性をもって基板表面または微粒子表面に効果的に結合させることができる。

[0024] 前記式中、Yは1個又は2個以上のチオール基または1個又は2個以上ジスルフィド基を有する基を示す。本明細書において「チオール基」とは $-SH$ で表される基であり、「ジスルフィド基」とは、 $-S-S-$ で表される構造を有する基である。

[0025] 前記ジスルフィド基としては、好ましくは環状ジスルフィド基が挙げられ、このうち5員環のジチオラニル基、たとえば1, 2-ジチオラン-3-イル基、1, 2-ジチオラン-4-イル基など、6員環のジチアニル基、たとえば1, 2-ジチアン-3-イル基、1, 2-ジチアン-4-イル基などが挙げられる。これらのうちでは、5員環のジチオラニル基が好ましく、1, 2-ジチオラン-3-イル基がより好ましい。また、チオクト酸(リボ酸)から誘導される基を用いることもできる。

[0026] これらのうちでは、ジスルフィド基が好ましい。ジスルフィド基の場合、ラクトース含有化合物を基板表面又は微粒子表面に強固に安定に固定化することができる。特に、前記式(I)で表される基では、通常ならば、ラクトース含有化合物のラクトース部位、リンカー部位、および側鎖部位の立体障害が予測され、結合密度の低下、感度低下などが考えられるが、本発明のように特定のリンカーと側鎖とジスルフィド基の組み合わせにより、強固で安定な固定化が可能となり、立体障害の影響がなく高感度のセンサーとすることができる。

これは、側鎖部位がリンカー部位の長さに応じて折り畳み構造をとり、折りたたまれた側鎖部位によって、糖脂質含有化合物同士がリシンのような糖結合性化合物との結合に適した高配向性をもって基板表面や微粒子表面に効果的に結合するためではないかと推測される。

[0027] さらに、式(I)において、前記 $-\text{COC}_n\text{H}_{2n}\text{Y}$ の主鎖に含まれる原子の合計数(N1)と、前記 $-\text{CH}(\text{OH})\text{C}=\text{CC}_p\text{H}_{2p}\text{CH}_3$ の主鎖に含まれる原子の合計数(N2)とは、好ましくは $\text{N1}:\text{N2}=1:1.5\sim 1:5$ 、さらに好ましくは $1:2\sim 1:3$ の範囲にある。

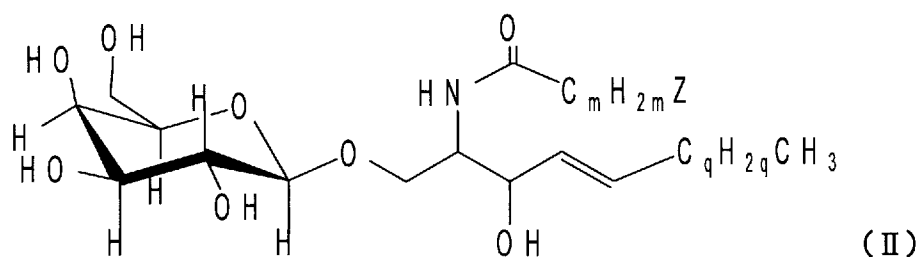
[0028] なお、N1においては、前記 $-\text{COC}_n\text{H}_{2n}\text{Y}$ においてY中の硫黄原子と $-\text{CO}$ とを最長で結合する複数の原子を、主鎖を構成する原子とし、Yがジスルフィド基の場合はそのうちの $-\text{CO}$ に近い硫黄原子側を主鎖上の原子とし、合計数N1には硫黄原子を含まない。また、N2においては、前記 $-\text{CH}(\text{OH})\text{C}=\text{CC}_p\text{H}_{2p}\text{CH}_3$ において末端の $-\text{CH}_3$ と $-\text{CH}(\text{OH})$ を最長で結合する複数の原子を、主鎖を構成する原子とする。

[0029] 式(I)中、 $-\text{NH}$ とこれに隣接する $-\text{OH}$ は、D-エリスロ体であることが好ましい。

[0030] このような式(I)の側鎖部位が含まれていると、側鎖部位が存在しない場合と比較して、検出感度を格段に向上させることができる。さらに、このような炭素数あるいは原子数で側鎖部位が構成され、側鎖部位が前記リンカー部位の長さよりも大きい長さとなる場合、ラクトース含有化合物をよりセンサーに適した配向性で基板や微粒子に固定することができるとともに、該ラクトース含有化合物を含有するセンサーチップ(バイオセンサー)あるいはラクトース含有化合物が固定された微粒子を含有する検出試薬を用いると、より微量のリシン60およびリシン120でも高感度に検出・定量できる。

[0031] <ガラクトース含有化合物>

前記ガラクトース含有化合物は、下記一般式(II)で表される。



[0032] 式中、mは2～20の整数を示し、好ましくは2～10、さらに好ましくは3～8、特に好ましくは3～5である。前記qは、好ましくは1～17の整数を示し、より好ましくは7～17、さらに好ましくは10～15である。

[0033] このような式(II)で表されるように、リンカー部位($-\text{COC}_m\text{H}_{2m}\text{Z}$)と側鎖部位($-\text{C}$

$\text{H}(\text{OH})\text{C}=\text{CC} \underset{\text{q}}{\text{H}} \underset{2\text{q}}{\text{CH}} \underset{3}{\text{CH}} \text{)}$ とを有すると、ガラクトース含有化合物をセンサーに適した配向性で高密度に基板や微粒子に固定することができるとともに、ガラクトース含有化合物が固定されたバイオセンサーあるいは微粒子を含有する検出試薬を用いると、極微量のリシン120でも高感度に検出・定量できる一方、リシン60については実質的に検出されない。

[0034] 特に、式(II)において、 m が上記範囲にあると、ガラクトース含有化合物を、基板表面あるいは微粒子表面に結合したときのセンサーの感度が向上するとともに、リシン120との結合に適した密度・配向性をもって基板表面または微粒子表面に効果的に結合させることができる。

[0035] 前記式(II)中、 Z は式(I)中の Y と同様であり、好ましい態様も同様である。

[0036] さらに、式(II)において、前記 $-\text{COC} \underset{\text{m}}{\text{H}} \underset{2\text{m}}{\text{Z}}$ の主鎖に含まれる原子の合計数($N1$)と、前記 $-\text{CH}(\text{OH})\text{C}=\text{CC} \underset{\text{q}}{\text{H}} \underset{2\text{q}}{\text{CH}} \underset{3}{\text{CH}} \text{}$ の主鎖に含まれる原子の合計数($N2$)とは、好ましくは $N1:N2=1:1.5 \sim 1:5$ 、さらに好ましくは $1:2 \sim 1:3$ の範囲にある。

[0037] なお、 $N1$ においては、前記 $-\text{COC} \underset{\text{m}}{\text{H}} \underset{2\text{m}}{\text{Z}}$ において Z 中の硫黄原子と $-\text{CO}$ とを最長で結合する複数の原子を、主鎖を構成する原子とし、 Z がジスルフィド基の場合はそのうちの $-\text{CO}$ に近い硫黄原子側を主鎖上の原子とし、合計数 $N1$ には硫黄原子を含まない。また、 $N2$ においては、前記 $-\text{CH}(\text{OH})\text{C}=\text{CC} \underset{\text{q}}{\text{H}} \underset{2\text{q}}{\text{CH}} \underset{3}{\text{CH}} \text{}$ において末端の $-\text{CH} \underset{3}{\text{CH}} \text{}$ と $-\text{CH}(\text{OH})$ を最長で結合する複数の原子を、主鎖を構成する原子とする。

[0038] 式(II)中、 $-\text{NH}$ とこれに隣接する $-\text{OH}$ は、 D -エリスロ体であることが好ましい。

[0039] このような式(II)の側鎖部位が含まれていると、側鎖部位が存在しない場合と比較して、検出感度を格段に向上させることができる。さらに、このような炭素数あるいは原子数で側鎖部位が構成され、側鎖部位が前記リンカー部位の長さよりも大きい長さとなる場合、ガラクトース含有化合物をより高度な配向性で基板や微粒子に固定することができるとともに、該ガラクトース含有化合物を含有するセンサーチップ(バイオセンサー)あるいはガラクトース含有化合物が固定された微粒子を含有する検出試薬を用いると、より微量のリシン120でも高感度に検出・定量でき、リシン60は検出されない。

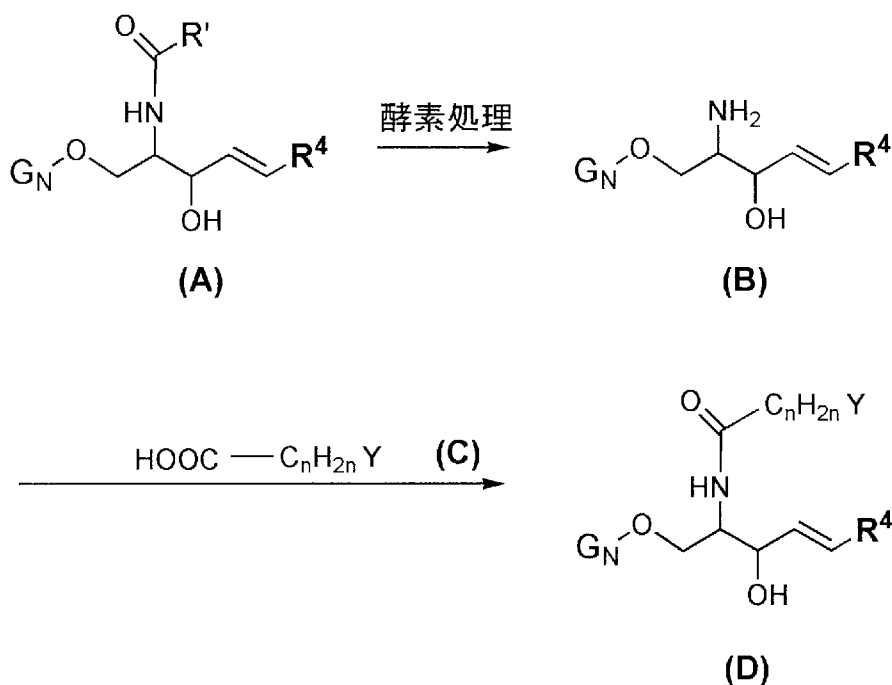
[0040] 以上のように、本発明で用いるラクトース含有化合物が固定された検出基材は、リシン60およびリシン120に対する結合能が極めて高く、本発明で用いるガラクトース含有化合物が固定された検出基材はリシン120に対してのみ結合能が極めて高い。

[0041] ラクトース含有化合物、ガラクトース含有化合物の製造方法

本発明で用いるラクトース含有化合物(I)、ガラクトース含有化合物(II)の製造方法に限定はないが、細胞二重層膜の表側に多く存在するスフィンゴ糖脂質(親水性基として糖、脂溶性基としてセラミド部位を有する糖脂質)などから誘導することができ、原料入手の容易性からも好適である。以下にラクトース含有化合物(I)を例にとって製造方法を説明する。ガラクトース含有化合物(II)も同様の方法で製造できる。

たとえば、下記工程1に示すような、出発原料として天然に由来するスフィンゴ糖脂質を用いる方法が挙げられる。

[0042] 工程1



スフィンゴ糖脂質(A) (式中、 G_N は式(I) 中のラクトース部分と同様であり、 R^4 は $-C_{10 \sim 18}H_{20 \sim 30}-CH_3$ であり、 R' は $-C_{10 \sim 20}H_{20 \sim 40}-CH_3$ である。)は、ガラクトースとグルコースが β 1-4 結合した糖鎖部位(ラクトース部位)と、スフィンゴシン塩基に脂肪酸がアミド結合したセラミドと呼ばれる脂質を骨格としている。該スフィンゴ糖脂質は、脊椎動物、無脊椎動物、植物などに広く存在する化合物である。

[0043] たとえば、該スフィンゴ糖脂質(A)を公知の方法を用いて酵素処理することにより(J. Biol. Chem., Vol.250, P.24370, 1995年)、セラミド部位にあるアミド結合を選択的に加水分解し、遊離のアミノ基をもつスフィンゴシン塩基が疎水性部となる一本鎖糖脂質である化合物(B) (リゾ体)を得ることができる。該酵素反応は、スフィンゴ糖脂質やスフィンゴミエリンに特異的作用することのできる酵素、スフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼ(Sphingolipid ceramide N-deacylase: SCDase, E.C. 3.5.1.69)を用いる。当該酵素はすべてのスフィンゴ糖脂質とスフィンゴミエリンに作用する。

[0044] 前記SCDaseは、反応液のpHや界面活性剤濃度により、加水分解以外に、縮合反応と脂肪酸交換反応も効率よく触媒することができる(J. Lipid Res., Vol.38, P.1923, 1997年)。

[0045] 前記酵素による加水分解反応は、スフィンゴ糖脂質10 μ molに対してSCDaseを好ましくは1~5U添加し、好ましくはpH5.5~6.5の酢酸緩衝液中で、界面活性剤としてたとえばタウロデオキシコール酸ナトリウム0.5%~2.0%の存在下、30~40°Cで実施することが好ましい。さらに反応液の上層部に、好ましくは反応液の10倍量に相当する炭素数10~18の炭化水素溶媒を加えることにより高い収率で化合物(B)を得ることができる。

[0046] 次に、得られた化合物(B)のアミノ基に、金属基板または微粒子表面と、金属-チオール結合による固定もしくは化学的および／または物理化学的な固定が可能なりンカー部位となる化合物(C)を化学結合により結合させて化合物(D)を得ることができる。このような化合物としては、たとえば、 $\text{HOOC}-\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{Y}$ (式中、 n 、 Y は前記式(I)中の n 、 Y と同意義である。)で表される、チオオクト酸、チオール基を末端に有する脂肪酸、ジスルフィド基を有する脂肪酸が挙げられる。

[0047] また、リンカー部位を誘導する化合物(C)は、あらかじめカルボン酸をN-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)などで活性化したものを用いてもよい。

リゾ体(B)のアミノ基と化合物(C)のカルボキシル基との反応は、溶媒中、必要に応じ縮合剤の存在下で実施する。化合物(C)の使用量は、リゾ体(B)に対して、1~3当量の範囲にあることが好ましい。

前記溶媒としては、たとえば、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキ

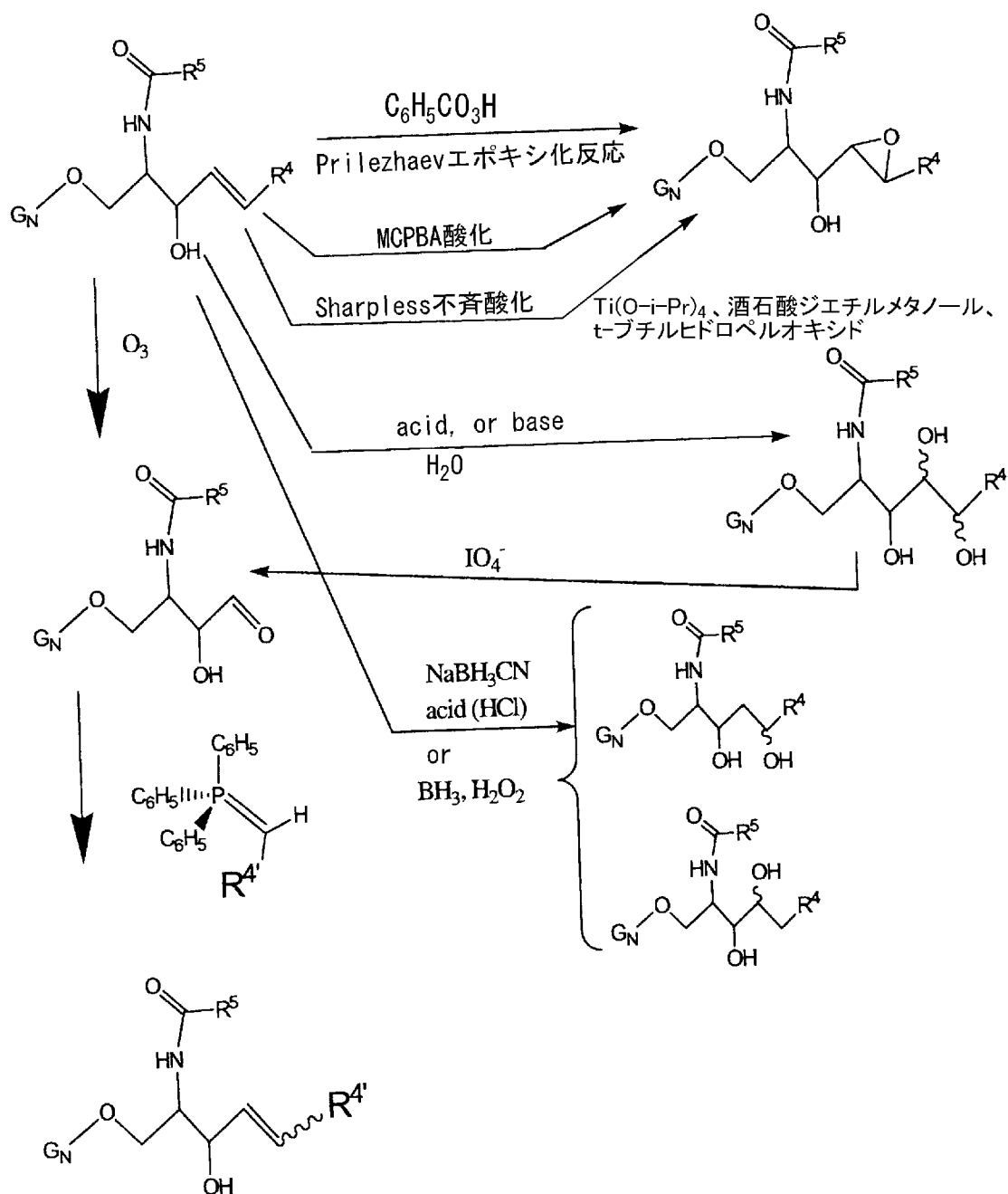
シド(DMSO)、アセトニトリル、エタノールなどの有機溶媒、水などが挙げられる。溶媒は、1種単独であるいは2種以上を混合して用いることができる。

- [0048] 縮合剤を用いる場合、たとえば、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリン塩(DMT-MM)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、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(EDCまたはWSC)などが挙げられる。また、N-メチルモルホリン(NMP)、NHS等の活性化剤を上記縮合剤と併用して用いることもできる。

反応は、好ましくは0℃から60℃の範囲の温度で、好ましくは1～48時間程度行う。

- [0049] ラクトース含有化合物(I)は、工程2に示すように、さらに側鎖部分の2重結合に、エポキシ基、水酸基の導入やアルデヒドに変換することにより、側鎖部分の炭素数を変換することができる。

工程2



[0050] 上記工程2において、 R^5 は $-\text{CH}_n-\text{Y}$ である。 R^4 は、 $-\text{CH}_p-\text{CH}_3$ で表される基である。 $\text{R}^{4'}$ は、 R^4 と異なる $-\text{CH}_p-\text{CH}_3$ で表される基である。

G_N 、 n 、 p は、前記と同義である。

[0051] オレフィン部分にエポキシ基を導入するには、アルカリ性過酸化水素 (Prilezhaev エポキシ化反応)、 m -クロロ過安息香酸 (m -chloro perbenzoic acid; MCPBA酸化)、 Ti(O-i-Pr)_4 と酒石酸ジエチルメタノールの存在下 $tert$ -ブチルヒドロペルオキシド (香月—Sharpless不斉酸化) などを用いて行うことができる。

- [0052] オレフィンに水酸基を導入するには、カンファースルホン酸(CSA)やp-トルエンスルホン酸(pTsOH)のような酸、もしくは、水酸化ナトリウム(NaOH)や水酸化カリウム(KOH)のような塩基の存在下、先のエポキシ基を開裂させ水酸基(ジオール)を導入できる。
- [0053] また、シアノ水素化ホウ素ナトリウム(NaBH_3CN)により、還元的に開裂させてもよい。あるいは、オレフィンに BH_3 を作用させ、その後、過酸化水素水で処理して、モノオール(モノアルコール)に変換できる(ヒドロボレーション)。
- [0054] さらに、オレフィンをオゾン気流下でオゾン酸化すると、アルデヒドが得られる。エポキシ基を開裂させて得られる水酸基(ジオール)を、過ヨウ素酸酸化して同様の誘導体を得ることもできる(但し、糖水酸基は、例えば、アセチル基などのアシル系保護基で保護しておく必要がある)。
- [0055] 得られるアルデヒドは、その後、Wittig反応により、任意の長さの炭化水素を有するリンイリドと反応させて、式(5)中の側鎖の長さを任意に変換することができる。
- [0056] 前記ラクトース含有化合物およびガラクトース含有化合物における糖鎖部位が、ラクトース、ガラクトースで記載されるセラミド型の糖脂質は、いずれも市販品(コスモバイオ、SIGMA、生化学工業、タカラバイオなど)から誘導できる。これらのセラミド誘導体は、sphingolipid ceramide N-deacylase (E.C. 3.5.1.69)による選択的な加水分解により、リゾ体へと変換でき、遊離したアミノ基にリボ酸のようなチオカルボン酸を反応させた後、センサーチップに固定化できる。
- [0057] <検出基材>
本発明に係るリシン検出用基材は、検出基材1および検出基材2を含むキットである。
前記検出基材1は、前記式(I)で表されるラクトース含有化合物が、Yを介して基材1の表面に固定されている。また、前記検出基材2は、前記式(II)で表されるガラクトース含有化合物が、Zを介して基材2の表面に固定されている。
なお、本明細書中、検出基材1および2を検出基材と総称し、基材1および2を基材と総称することがある。
- [0058] 基材としては、金属基板、ガラス基板、微粒子などが挙げられる。微粒子としては、

金属微粒子、半導体微粒子などが挙げられる。

基材が金属基板の場合、検出基材は下記のセンサーチップとして用いることができ、SPRなどの方法により、測定を行う。検出基材1は下記のセンサーチップ1として、検出基材2は下記のセンサーチップ2として用いられる。

基材がガラス基板の場合、あらかじめシランカップリング法などにより、ガラス基板表面にチオール基あるいはジスルフィド基と反応可能な官能基を導入し、それを介して前記ラクトース含有化合物および前記ガラクトース含有化合物が固定化される。この検出基材は分光分析法によるタンパク質定量や光導波路による光学的方法などで用いられる。

基材が金属微粒子や半導体微粒子などの微粒子の場合、検出基材は検出試薬に適用することができる。具体的には、検出基材1は微粒子1の表面に前記ラクトース含有化合物が固定されたリシン検出用微粒子1であり、検出基材2は微粒子2の表面に前記ガラクトース含有化合物が固定されたリシン検出用微粒子2である。これらは検出試薬やテストストリップ（例えば、ペーパークロマトや試験紙など）として用いられる。

以下に、センサーチップおよび検出試薬の場合について詳説する。

[0059] <センサーチップ1および2、リシン検出用センサーチップ>

本発明に係るリシン検出用センサーチップは、下記のセンサーチップ1およびセンサーチップ2を含む。

該センサーチップ1および2は、それぞれ前記ラクトース含有化合物または前記ガラクトース含有化合物がリンカー部位を介して金属基板表面に固定されている。

具体的には、本発明で用いるセンサーチップ1は、前記式(I)で表されるラクトース含有化合物が、Yを介して金属基板1の表面に固定されている。また、本発明で用いるセンサーチップ2は、前記式(II)で表されるガラクトース含有化合物が、Zを介して金属基板2の表面に固定されている。

[0060] これらセンサーチップ1とセンサーチップ2とは、前記ラクトース含有化合物およびガラクトース含有化合物が別々の金属基板に固定されて、センサーチップ1とセンサーチップ2とが独立して存在していてもよいし、前記ラクトース含有化合物およびガラクト

ース含有化合物が同一の金属基板上に固定されて、センサーチップ1とセンサーチップ2とが同一基板上で共存していてもよい。同一基板上に共存する場合、前記ラクトース含有化合物およびガラクトース含有化合物の固定をアレイ状に行うこともできる。

[0061] 前記金属基板の素材としては、たとえば、好ましくは金、銀、白金、銅、パラジウムなどが挙げられ、これらのうちさらに好ましくは金または白金、特に好ましくは金が挙げられる。基板の形状は限定されず、板状、管状、棒状、球状などの形状が挙げられる。このうち板状の形状を有する基板を好ましく用いることができる。

[0062] 金属基板への固定化は、好ましくは、金属表面と、チオール基(-SH)あるいはジスルフィド基(-S-S-)の直接的な金属-チオール結合や吸着により行うことができる。したがって、この場合、前記ラクトース含有化合物またはガラクトース含有化合物のうち、配糖体の末端に、-SHまたはジスルフィド基を末端に有する化合物が好ましい。

[0063] 前記ラクトース含有化合物およびガラクトース含有化合物の場合、側鎖部位の自己組織化による相乗効果により、高度な配向性と高密度な固定が可能となる。さらに、この自己組織化は、スフィンゴシン塩基のような天然由来の側鎖を有することが望ましい。これは、センサーチップの基板表面が、細胞膜の表面状態に近似した状態にあるためではないかと推測される。

[0064] 基板との結合は、自己組織化単分子膜(SAM: Self-Assembled Monolayer)法などを用いて行うことができる。すなわち、チオール基あるいはジスルフィド基を有する化合物が、金などと金属-チオール結合により特異的に吸着し、アルキル鎖間のvan der Waals 力によりSAMを形成させる方法である。

[0065] 前記ラクトース含有化合物およびガラクトース含有化合物が、-SHまたはジスルフィド基を末端に有する場合、前記ラクトース含有化合物およびガラクトース含有化合物による金属基板表面への単分子膜の構築は、特殊な装置を必要とせず、これら誘導体の溶液中に基板を浸漬するだけで容易に実施できる。また、浸漬条件(溶媒、濃度、温度、時間)によって構造、配向の制御も可能である。ここで用いられる溶媒は特に限定されるものではないが、固定化させる誘導体が溶解する有機溶媒あるいは

緩衝液であることが好ましい。

[0066] 通常、金属基板表面における前記ラクトース含有化合物およびガラクトース含有化合物の結合割合は、それぞれ好ましくは $0.1 \sim 10$ 個/ nm^2 、さらに好ましくは $1 \sim 10$ 個/ nm^2 の範囲である。このような結合割合であると、優れた検出感度を発揮することができる。

特に、前記ラクトース含有化合物およびガラクトース含有化合物において、側鎖部位が前記リンカー部位よりも長くなると、側鎖部位がリンカー部位の長さに応じて折り畳み構造をとり、折りたたまれた側鎖部位によって、前記ラクトース含有化合物およびガラクトース含有化合物同士がリシン60あるいはリシン120との結合に適した配向性をもって基板表面や微粒子表面に効果的に結合するためではないかと推測される。それにより、上記のような好ましい結合割合が達成されたものと推測される。

[0067] このような、本発明で用いるラクトース含有化合物が固定化されたセンサーチップ1は、リシン60およびリシン120に対する検出感度が極めて高く、本発明で用いるガラクトース含有化合物が固定化されたセンサーチップ2はリシン120に対してのみ検出感度が極めて高い。

[0068] <リシン検出用センサーチップを用いるリシンの検出方法>

本発明に係る各センサーチップ(センサーチップ1および2)を用いるリシンの検出方法は、試験化合物を、センサーチップの基板表面に接触させ、基板表面に結合したリシン60あるいはリシン120を検出し、存在を推定するというものである。

[0069] 検出の基本工程は下記の通りである。

- (1) 試験化合物を、前記センサーチップの表面に接触させる工程。
- (2) センサーチップに結合したリシン60またはリシン120を検出する工程。

[0070] 前記センサーチップ1または2と、試験化合物との接触は通常、溶媒の存在下で行うことが好ましい。前記センサーチップを用いるリシンの検出においては、これらが変性しない溶媒を選択することが必要であり、たとえば水または緩衝液などを用いる。

溶媒のpHは、好ましくは $4 \sim 8$ の範囲であり、温度は好ましくは $0 \sim 60^\circ\text{C}$ 、さらに好ましくは $25 \sim 40^\circ\text{C}$ の範囲である。

[0071] 緩衝液は、たとえば、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、HEPES緩衝液、またはトリス緩衝

液、より好ましくはHEPES緩衝液(10mM、pH:7.5、NaCl:0.15N)などが挙げられる。

[0072] 以下に、本発明に係るセンサーチップのうち、表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance:SPR)による、リシンの検出方法の一例を示す。SPRによる検出方法では、標識物質を用いることなく試験化合物(アナライト、分析対象化合物ともいう)の変化を検出することができる。このSPRの現象は、表面プラズモン(SP)とp偏向単色光を臨界角以上で入射することにより金属/液体界面で生じるエバネッセント波が共鳴することで、反射光に急峻な減衰を示す光学現象であり、これにより、センサーチップ表面/液体界面の誘電率変化をプラズモン共鳴角(SPRシグナル)から検出できる。すなわち、金属表面に固定化した物質と検体との間の二分子間結合および解離の変化をSPRシグナルから定量的に得られる。

[0073] このようなSPRシグナルを計測することにより、高感度に、センサーチップ1の場合、リシン60およびリシン120を、センサーチップ2の場合、リシン120を検出することができる。

[0074] リシンの検出は、温度を好ましくは0～60℃、さらに好ましくは25～40℃の範囲で一定に保持し、好ましくはリン酸緩衝液、酢酸緩衝液、HEPES緩衝液、またはトリス緩衝液、より好ましくはHEPES緩衝液で行う。

[0075] これに試験化合物を含む溶液をゆっくりと注入する。アフィニティー定数を求める場合には、リシンの濃度を変化させ、2～8回の測定をすることが望ましい。反応時間は結合・解離反応ともに3～30分程度が好ましいが、目的の相互作用によっては測定時間を変更する場合がある。

[0076] また、緩衝液の流速は好ましくは3～50 μ L/minで、検体量はpM～ μ Mを1回の測定につき5～1000 μ L程度にするのが好ましい。アフィニティー定数は2～8点の測定濃度を取り、各濃度のセンサーグラムにおいて、平衡状態よりスキッチャードプロットを作成してアフィニティー定数(K_d および K_a)を算定する。

[0077] このような、本発明のセンサーチップを用いる、表面プラズモン共鳴バイオセンサーは、極微量(1ng程度)のリシンでも、前処理あるいは標識物質を用いなくて、高感度に検出することができる。

すなわちセンサーチップ1とリシン60および120との結合速度定数(K_a)および解離

定数(K_D)は、前記式(I)で表されるラクトースセラミド化合物の場合において高い値および小さい値を示す。

またセンサーチップ2とリシン120との結合速度定数(K_a)および解離定数(K_D)は、前記式(II)で表されるガラクトースセラミド化合物の場合において高い値および小さい値を示す。

[0078] このような効果はスフィンゴシン塩基などの側鎖部位の自己組織化機能により、高度な配向性と高密度な固定化が行われ、複数の近接する糖鎖部位が効率よくリシンを強く結合させるためである。

[0079] 通常、センサーチップ1によるリシン60およびリシン120の検出、センサーチップ2によるリシン120の検出において、「化合物が実質的に結合している」場合には、ノイズ程度の結合は含まない。この場合、具体的にノイズと判断し結合していないと判定するか、実質的に結合しているかの判定は、予め、それぞれのセンサーチップ1および2毎の絶対感度を測定し、ノイズと判定する基準となる標準数値を設定しておくことにより、十分な確度を持って判定可能である。標準数値としては、たとえば下記のいずれかに該当する場合が挙げられる。

- [0080] (i) センサーチップ1を用いて、SPR法により特定条件下でリシン60を測定した場合のレスポンス(RU)値を標準数値とし、該標準数値の(1/3~1/2)以下である場合、ノイズと判定する。
- (ii) センサーチップ1を用いて、SPR法により特定条件下でリシン120を測定した場合のレスポンス(RU)値を標準数値とし、該標準数値の(1/3~1/2)以下である場合、ノイズと判定する。
- (iii) センサーチップ2を用いて、SPR法により特定条件下でリシン120を測定した場合のレスポンス(RU)値を標準数値とし、該標準数値の(1/3~1/2)以下である場合、ノイズと判定する。

[0081] 標準数値の設定における特定条件としては、たとえば、上記(i)~(iii)のセンサーチップ1、2において、式中、 $n=m=4$ 、 $p=q=13$ 、 $Y=Z=1$ 、2-ジチオラン-3-イル基であり、タンパク質濃度が $10\mu\text{g/mL}$ 、 10mM HEPES (pH7.5、NaCl0.15M)、流速 $10\mu\text{L/min}$ 、温度 25°C (Biacore2000: 商品名)の条件下で行ったも

のが挙げられる。特に、高度な分析(検出)を行う場合には、上記タンパク質濃度が1～10ng/mLの条件で行うことが好ましい。また、必要に応じ、タンパク質濃度に対する検量線を作成してもよい。この検量線により未知試料のタンパク質濃度を決定することもできる。

- [0082] また、非特異的な結合かどうかの判定は、ラクトースあるいはガラクトースを阻害剤として試験化合物に添加した後、測定することでシグナルが抑制又はノイズ程度になることから推測できる。さらに、ノイズであるかどうかは、試験化合物に含まれるリシン60や120の濃度にも依存するが、通常、公知の分析手法に従い、一定条件における検出値に換算して、検出確度を推測することもできる。

[0083] <リシン検出用微粒子、検出試薬、リシン検出用キット>

リシン検出用微粒子

本発明で用いるリシン検出用微粒子1は、前記ラクトースセラミド化合物が、微粒子1の表面に固定されている微粒子である。

本発明で用いるリシン検出用微粒子2は、前記ガラクトースセラミド化合物が、微粒子2の表面に固定されている微粒子である。

本明細書中、微粒子1および2を微粒子と、リシン検出用微粒子1および2を、リシン検出用微粒子と、検出試薬1および2を検出試薬と総称することがある。

- [0084] 前記のとおり、微粒子としては、金属微粒子、半導体微粒子が挙げられる。

- [0085] 金属微粒子の素材としては、好ましくは金、銀、白金、銅、パラジウムなどが挙げられ、これらのうちより好ましくは金または白金、特に好ましくは金である。

半導体微粒子の素材としては、好ましくはZn、Cd等のII族元素と、O、S等のVI族元素とを組み合わせたII-VI族系化合物であるZnS系、CdSe系ナノ粒子あるいは複合体粒子などが挙げられる。

- [0086] このような微粒子は、平均粒子径が、好ましくは1～100nm、さらに好ましくは1～50nmの範囲にある。

- [0087] 金属微粒子は、単分散な粒子径であることが好ましい。この範囲の金属微粒子を用いることで、視覚的に検出可能なシグナル色(例えば、金の場合:オレンジ～赤色、銀の場合:黄色)が得られ、かつ溶媒中における分散安定性が良好になり、高感度で

検出時間の短縮を図ることができる。

[0088] 本発明で用いる金属微粒子は、公知の方法により製造することができる。たとえば、金微粒子は、Frensの方法を用いることにより、種々の大きさの微粒子を容易に製造することができる(Nature Phys. Sci., Vol.241, P.20, 1973年)。

[0089] 具体的には、たとえば金微粒子の製造方法としては、塩化金の溶液を加熱沸騰させ、ついで、クエン酸ナトリウムの溶液と混合して塩化金を還元する方法により行うことができる。上記二つの溶液を混合するとすぐに沸騰溶液は薄い青色に変色して核生成が開始される。ついで、すぐに青色から赤色に変わって単一分散微粒子の生成が起こり、塩化金の還元は沸騰をさらに続けることで完了する。

得られる金属微粒子の粒子径は、クエン酸ナトリウム溶液の濃度を変化させることにより調整することができる。このような金微粒子は溶液中に分散して存在することが好ましく、その状態は特に限定されないが、金微粒子が安定な分散状態で存在していることが好ましい。例えば、コロイド状態(分散コロイド状態)となることがより好ましい。

[0090] また、本発明で用いる半導体微粒子は、公知の方法により製造することができる。例えば、メルカプトエタノールやメタクリル酸のような水溶性の有機配位子を含む水溶液により半導体超微粒子を合成する方法がある。中でも、特開2002-201471号公報に示すような中和共沈法と称される方法は、表面配位された半導体微粒子が水中に分散した形態で合成されることから、特に、ZnS微粒子を合成する際によく用いられている。このZnS微粒子は、Zn及び有機配位子を含む水溶液に硫化ナトリウムを投入し、中和共沈反応を生じさせることにより、水中に分散した形態で合成される。得られる半導体微粒子の粒子径は、有機配位子濃度などを変化させることにより調整することができる。このような半導体微粒子の状態は特に限定されないが、乾燥もしくは溶液中に分散した状態が好ましい。特に、コロイド状態(分散コロイド状態)となることがより好ましい。

[0091] 金属微粒子や半導体微粒子などの微粒子に、ラクトース含有化合物またはガラクトース含有化合物を固定化する方法としては、前記センサーチップにラクトース含有化合物またはガラクトース含有化合物を固定化した方法を応用することが可能である。

すなわち、微粒子を分散させた溶液とラクトース含有化合物またはガラクトース含有化合物の溶液を5分以上混合する。この時、微粒子に対して十分量のラクトース含有化合物またはガラクトース含有化合物が固定されれば、金属コロイドは安定に分散され、リシン検出用微粒子を得ることができる。ここで、微粒子表面におけるラクトース含有化合物またはガラクトース含有化合物の結合割合は、溶液中のラクトース含有化合物またはガラクトース含有化合物の濃度やその他条件(例えば、溶媒、温度、時間など)でコントロールすることができる。

[0092] 通常、微粒子表面におけるラクトース含有化合物またはガラクトース含有化合物の結合割合は、好ましくは $0.1 \sim 10$ 個/ nm^2 、さらに好ましくは $1 \sim 10$ 個/ nm^2 の範囲である。このような結合割合であると、優れた検出感度を発揮することができる。

特に、本発明で用いる式(I)、(II)の前記ラクトース含有化合物またはガラクトース含有化合物においては、特定の原子数で側鎖部位、リンカー部位が構成される。この場合、特に、側鎖部位が前記リンカー部位よりも長い場合、側鎖部位がリンカー部位の長さに応じて折り畳み構造をとり、折りたたまれた側鎖部位によって、ラクトース含有化合物またはガラクトース含有化合物同士がリシンとの結合に適した配向性をもって基板表面や微粒子表面に効果的に結合するためではないかと推測される。それにより、上記のような好ましい結合割合が達成されたものと推測される。

[0093] また、このようなリシン検出用微粒子は、溶液形態で保存することが、該微粒子の保存安定性の観点から好ましい。

この場合、前記式(I)または(II)で表されるラクトース含有化合物またはガラクトース含有化合物が結合したリシン検出用微粒子は、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{Y}$ または $-\text{C}(=\text{O})-\text{C}_m\text{H}_{2m}-\text{Z}$ で表されるリンカー部位において、 n および m が、それぞれ、 $2 \sim 20$ の整数、好ましくは $2 \sim 10$ の整数、さらに好ましくは $3 \sim 8$ 、特に好ましくは $3 \sim 5$ であり、リンカー部位の長さが特定範囲以内にあるため、溶液中での分散安定性に極めて優れている。したがって、本発明で用いるラクトース含有化合物またはガラクトース含有化合物が結合したリシン検出用微粒子は、特に溶液中での使用に優れる。

[0094] 前記ラクトース含有化合物またはガラクトース含有化合物の微粒子への固定化においては、ラクトース含有化合物またはガラクトース含有化合物の高度な配向性と高

密度な固定を目的にしていることから、必要十分量のラクトース含有化合物またはガラクトース含有化合物を混合して固定化を図ることが好ましいが、過剰量のラクトース含有化合物またはガラクトース含有化合物を混合すると、混合溶液中からの除去作業が必要となる。

[0095] たとえば、金微粒子の場合、ラクトース含有化合物またはガラクトース含有化合物を固定化した金微粒子の分散溶液の分散安定性と色調変化の関係から、ラクトース含有化合物またはガラクトース含有化合物の最適な混合量を決定することができる。

すなわち、添加した化合物が最適以下の場合、ラクトース含有化合物またはガラクトース含有化合物を自己組織化するための十分な量に達しないため、金微粒子表面の疎水性が増加して分散安定性の低下し、色調の変化および凝集－沈殿を生じる。

また、添加した化合物が最適以上の場合、リシンを添加した後、凝集反応が過剰に添加した化合物によって阻害され、色調変化が小さくなることから、過剰量の化合物を除去する必要がある。したがって、分散安定性に優れ、かつリシン添加後の凝集反応が明確な添加量が最適添加量となる。

[0096] また、CdSe/ZnS複合などの半導体微粒子の場合でも、上記手法を用いることでラクトース含有化合物またはガラクトース含有化合物の最適な混合量を決定することができる。

[0097] 検出試薬

前記微粒子へのラクトース含有化合物またはガラクトース含有化合物の固定化により、リシン検出用微粒子を得ることができるが、該微粒子を含む溶液は、そのまま本発明のリシンの検出試薬として使用することができる。

このため、前記固定化に使用する溶媒は、検出対象となるリシンが変性しないことが必要であり、たとえば水または緩衝液などを用いる。

溶媒のpHは、好ましくは6～8の範囲であり、温度は好ましくは0～60℃、さらに好ましくは25～40℃の範囲である。

[0098] 緩衝液は、たとえば、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、HEPES緩衝液、またはトリス緩衝液、より好ましくはHEPES緩衝液(10mM、pH:7.5、NaCl:0.15N)などが挙げられる。

- [0099] このようにして、リシン検出用微粒子の合成に伴って、リシン検出用微粒子を溶媒中に含有する検出試薬が得られることとなる。
- [0100] 金属微粒子の場合、このような検出試薬においては、溶液中に微粒子がコロイドになって存在していることが好ましく、該コロイドは分散して存在していることがより好ましい。
- [0101] 金属微粒子の金属コロイドが安定化されたかの確認は、たとえば、金コロイドの場合、混合溶液に等量の10%塩化ナトリウム水溶液を加えて、金コロイドの色調に変化がなければ安定化されていると認定することができる。
- [0102] 半導体微粒子の場合も同様に、溶液中に微粒子がコロイドになって存在していることが好ましく、該コロイドは分散して存在していることがより好ましい。
- [0103] 半導体微粒子の分散が安定化されたかの確認は、たとえば、混合溶液に等量の10%塩化ナトリウム水溶液を加えて、分散溶液に紫外線を照射した時に得られる蛍光の強度に変化が無ければ安定化されていると認定することができる。
- [0104] 検出試薬中のリシン検出用微粒子の濃度は、好ましくは $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^{15}$ 個/L、さらに好ましくは $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^{13}$ 個/Lの範囲である。
- このような濃度範囲であると、リシン検出用微粒子のコロイドが分散して安定に存在し、保存安定性を向上させることができるとともに、リシンの検出感度を向上させることができる。
- [0105] このような、本発明で用いるラクトース含有化合物が固定化されたリシン検出用微粒子1を含む検出試薬1は、リシン60およびリシン120に対する検出感度が極めて高く、本発明で用いるガラクトース含有化合物が固定化されたリシン検出用微粒子2を含む検出試薬2は、リシン120に対してのみ検出感度が極めて高い。
- [0106] 本発明に係るリシン検出用キットは、前記検出試薬1および2を含む。
- [0107] <検出試薬を用いるリシンの検出方法>
- 本発明で用いる各検出試薬(検出試薬1および2)を用いるリシンの検出方法は、試験化合物を、検出試薬中のリシン検出用微粒子表面に接触させ、さらに、微粒子表面に結合したリシン60あるいはリシン120を検出するというものである。
- [0108] 検出の基本工程は下記の通りである。

(1) 試験化合物を、前記検出試薬に添加して、リシン検出用微粒子に接触させる工程。

(2) リシン検出用微粒子に結合したリシン60またはリシン120を検出する工程。

[0109] リシン検出用微粒子に結合したリシンの検出手段としては、たとえば、金属微粒子を用いる場合、リシン検出用微粒子のコロイド溶液において、該微粒子がリシンと結合する際の色調変化から該リシンの検出を行う方法が挙げられる。

具体的には、たとえば、金微粒子の場合、リシンがリシン検出用微粒子と結合していない状態において、前記微粒子のコロイド粒子が分散した状態で溶液は赤色を示すが、リシンが結合すると前記微粒子が凝集して赤色が薄れるあるいは無色透明に変化する、または、凝集体(沈殿物)が生じる。

したがって、前記検出工程1において、赤色の凝集沈殿が薄れるか無色透明になった場合、リシン60またはリシン120の存在を推定でき、前記検出工程2において、赤色の凝集沈殿が薄れるか無色透明になった場合、リシン120の存在を推定できる。

[0110] 色調変化の計測手法としては、目視により観測し、その結果に基づいて測定対象物質の存在を簡便に半定量することができる。

[0111] また、色調変化を分光光度計により高感度検出することも可能である。その場合、色調変化を測定するための波長としては、色調変化を測定可能な波長であれば、特に限定されないが、たとえば、金微粒子の場合、金微粒子の極大吸収波長付近500～550nm付近が測定感度を高くすることができるので望ましい。多波長による吸光度測定を行うことで、精度の高い検出が可能であることは言うまでもない。

色調変化の測定を行える装置としては、比色計、分光光度計、マイクロプレートリーダー、生化学自動分析機等が挙げられる。

[0112] また、半導体微粒子を用いる場合、リシン検出用微粒子の溶液において、該微粒子がリシンと結合する際の蛍光強度の変化から該リシンの検出を行う方法が挙げられる。

[0113] このような色調変化あるいは蛍光強度の変化を計測することにより、高感度に、リシン検出用微粒子1を含む検出試薬1の場合、リシン60およびリシン120を、リシン検

出用微粒子2を含む検出試薬2の場合、リシン120を、極めて簡便に短時間で検出することができる。

〈テストストリップ〉

前記ラクトース含有化合物は、リシン60および120と特異的に結合し、前記ガラクトース含有化合物は、リシン120と特異的に結合するので、これら化合物を固定化した金属微粒子および半導体微粒子はテストストリップ（例えば、ペーパークロマトや試験紙など）に用いることができる。

ここでテストストリップとは、試験化合物の溶液をろ紙や高分子膜に浸透させることで簡便にかつ短時間で判定する検査キットを意味する。具体的には、ろ紙や高分子膜の一部に標的物質（リシン）が結合しうる処理（例えば、化学的結合、糖鎖や抗体を用いた特異的結合など）を行い、テストストリップに試験化合物の溶液を浸透させることで、その処理部分に試験化合物が保持される。つぎに、前記ラクトース含有化合物および前記ガラクトース含有化合物を固定化した金属微粒子あるいは半導体微粒子と接触させることで、処理部分が着色され、目視あるいは分光計測機器などで検出することができる。

- [0114] また、毛細管現象を利用したいわゆるクロマト法によるテストストリップを用いた検出方法も行うことができる。すなわち、メンブレン上に標的物質（リシン）が結合しうる処理（例えば、化学的結合、糖鎖や抗体を用いた特異的結合など）を行う。テストストリップに添加された試験化合物の溶液は、毛細管現象によりストリップ上を移動する。その移動過程で、前記ラクトース含有化合物および前記ガラクトース含有化合物を固定化した金属微粒子あるいは半導体微粒子を接触させることで、これら微粒子は標的物質（リシン）と結合する。つぎに、メンブレン上に処理した部分は標的物質（リシン）と結合を起こし、その結果、メンブレン上に微粒子による有色あるいは蛍光発光の判定ラインが現れることで検出される。

このような検出・判定キットは簡便でかつ短時間で検出することができる。

なお本明細書において引用されたすべての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

図面の簡単な説明

- [0115] [図1]化合物(Ia)、化合物(IIa)、化合物(IIIa)を固定化したセンサーチップによるリシン60との相互作用を表したSPRセンサーグラムである。ここで、リシン60溶液の注入量は $1\mu\text{g/mL}$ 溶液を $100\mu\text{L}$ であり、流速 $10\mu\text{L/min}$ 、温度 25°C の結果である。
- [0116] [図2]化合物(Ia)、化合物(IIa)、化合物(IIIa)を固定化したセンサーチップによるリシン120との相互作用を表したSPRセンサーグラムである。ここで、リシン120溶液の注入量は $1\mu\text{g/mL}$ 溶液を $100\mu\text{L}$ であり、流速 $10\mu\text{L/min}$ 、温度 25°C の結果である。
- [0117] [図3]化合物(Ia)を固定化したセンサーチップ(1a)によるリシン60との相互作用を表したSPRセンサーグラムである。ここで、リシン60濃度を $0.01\mu\text{g/mL}$ 、 $0.1\mu\text{g/mL}$ 、 $1\mu\text{g/mL}$ 、 $10\mu\text{g/mL}$ と変化した溶液を $100\mu\text{L}$ 注入し、流速 $10\mu\text{L/min}$ 、温度 25°C の結果である。
- [0118] [図4]化合物(IIa)を固定化したセンサーチップ(2a)によるリシン60との相互作用を表したSPRセンサーグラムである。ここで、リシン60濃度を $0.01\mu\text{g/mL}$ 、 $0.1\mu\text{g/mL}$ 、 $1\mu\text{g/mL}$ 、 $10\mu\text{g/mL}$ と変化した溶液を $100\mu\text{L}$ 注入し、流速 $10\mu\text{L/min}$ 、温度 25°C の結果である。
- [0119] [図5]化合物(IIIa)を固定化したセンサーチップ(3a)によるリシン60との相互作用を表したSPRセンサーグラムである。ここで、リシン60濃度を $0.01\mu\text{g/mL}$ 、 $0.1\mu\text{g/mL}$ 、 $1\mu\text{g/mL}$ 、 $10\mu\text{g/mL}$ と変化した溶液を $100\mu\text{L}$ 注入し、流速 $10\mu\text{L/min}$ 、温度 25°C の結果である。
- [0120] [図6]化合物(Ia)を固定化したセンサーチップ(1a)によるリシン120との相互作用を表したSPRセンサーグラムである。ここで、リシン120濃度を $0.01\mu\text{g/mL}$ 、 $0.1\mu\text{g/mL}$ 、 $1\mu\text{g/mL}$ 、 $10\mu\text{g/mL}$ と変化した溶液を $100\mu\text{L}$ 注入し、流速 $10\mu\text{L/min}$ 、温度 25°C の結果である。
- [0121] [図7]化合物(IIa)を固定化したセンサーチップ(2a)によるリシン120との相互作用を表したSPRセンサーグラムである。ここで、リシン120濃度を $0.01\mu\text{g/mL}$ 、 $0.1\mu\text{g/mL}$ 、 $1\mu\text{g/mL}$ 、 $10\mu\text{g/mL}$ と変化した溶液を $100\mu\text{L}$ 注入し、流速 $10\mu\text{L/min}$ 、温度 25°C の結果である。
- [0122] [図8]化合物(IIIa)を固定化したセンサーチップ(3a)によるリシン120との相互作用を表したSPRセンサーグラムである。ここで、リシン120濃度を $0.01\mu\text{g/mL}$ 、 $0.1\mu\text{g/mL}$

、 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ と変化させた溶液を $100\text{ }\mu\text{L}$ 注入し、流速 $10\text{ }\mu\text{L/min}$ 、温度 25°C の結果である。

[0123] [図9]化合物(Ia)、化合物(IIa)、化合物(IIIa)を固定化したセンサーチップによる各種タンパク質との相互作用を表したグラフである。ここで、タンパク質溶液の濃度を $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ として、タンパク質溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$ を流速 $10\text{ }\mu\text{L/min}$ で注入したときのSPRシグナルの値を示している。

[0124] [図10]化合物(Ia)、化合物(IIa)、化合物(IIIa)を金微粒子に固定化した検出試薬を用いたリシン検出試験の結果を示した図である。試験条件は、試薬(1b)～(3b) $200\text{ }\mu\text{L}$ にリシン溶液 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 溶液を $100\text{ }\mu\text{L}$ 添加、室温で10分間静置した。

[0125] [図11]化合物(Ia)、化合物(IIa)、化合物(IIIa)を金微粒子に固定化した検出試薬を用いた各種タンパク質によるリシン特異性評価試験の結果を示した図である。試験条件は、試薬(1b)～(3b) $200\text{ }\mu\text{L}$ に各種タンパク質溶液 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 溶液を $100\text{ }\mu\text{L}$ 添加、室温で10分間静置した。

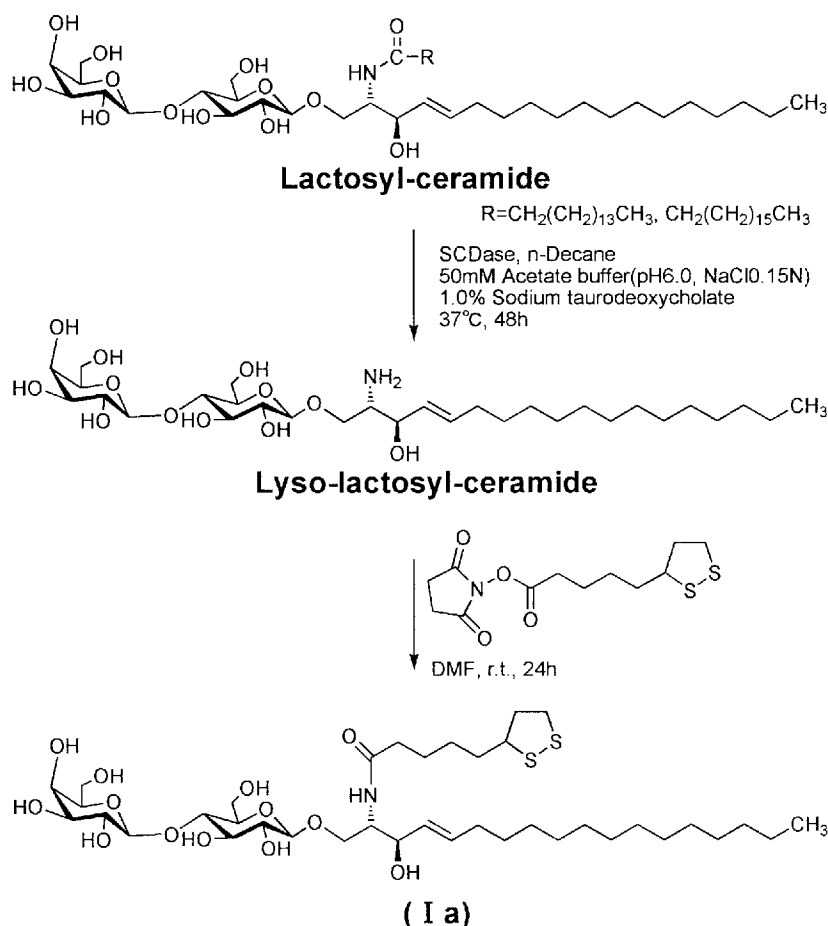
発明を実施するための最良の形態

[0126] 以下に、本発明の実施例および比較例を挙げ、具体的に説明するが、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

[0127] ＜糖脂質含有化合物の合成＞

実施例 1

[0128]



[0129] [酵素反応によるセラミド部位の選択的加水分解]

Lactosyl-ceramide 10.0mg (11.0 μ mol) (SIGMA社製)を1.0%タウロデオキシコール酸ナトリウムの50mM酢酸緩衝液 (pH6.0) 10mLに溶かし500mL梨型フラスコに入れた。次にスフィンゴ脂質セラミドN-デアシラーゼ (SCDase) 1.5U (タカラバイオ社製)を加え、N-デカン100mLを反応液と混ざらないように静かに加えて37°Cで24時間反応させた後、さらにSCDase 0.5Uを加えて37°Cで24時間反応させた。上層部であるN-デカンを取り除いた後、反応液を沸騰した水浴中で3分間熱した。さらに、反応液はフィルターで濾過した後、濃縮した。

[0130] ODSカラムクロマトグラフィーで精製した。その結果、Lyso-lactosyl-ceramideを収率73% (5.0mg) で得た。

[0131] ¹H-NMR (600MHz, CD₃OD): δ 5.756(dt, 1H, -CH(OH)-CH=CH-CH₂-, J=6.8Hz, 15.4Hz), 5.486(dd, 1H, -CH(OH)-CH=CH-CH₂-, J=7.6Hz, 15.4Hz), 4.352(d, 1H, Gal H-1, J=7.7Hz), 4.297(d, 1H, Glc H-1, J=7.7Hz), 3.988(t, 1H, -CH(NH₂)-CH(OH)-

, J=6.8Hz), 3.899(dd, 1H, Glc H-6, J=2.4Hz, 12.1Hz), 3.832(dd, 1H, Glc H-6', J=4.4Hz, 12.1Hz), 3.85-3.82(m, 1H, -O-CH₂-CH(NH₂)-), 3.812(brd, 1H, Gal H-4, J=3.3Hz), 3.777(dd, 1H, Gal H-6, J=7.4Hz, 11.4Hz), 3.77-3.74(m, 1H, -O-CH₂-CH(NH₂)-), 3.695(dd, 1H, Gal H-6', J=4.7Hz, 11.4Hz), 3.59-3.50(m, 4H, Glc H-3, H-4, Gal H-2, H-5), 3.476(dd, 1H, Gal H-3, J=3.3Hz, 9.5Hz), 3.43-3.39(m, 1H, Glc H-5), 3.28(overlap, 1H, Glc H-2), 2.94-2.89(m, 1H, -CH(NH₂)-CH(OH)-), 2.11-2.06(br, 2H, -CH=CH-CH₂-CH₂-), 1.37-1.25 (m, 22H, -(CH₂)-), 0.897(t, 3H, -CH₂-CH₃, 7.0Hz).

ESI(+)-MS m/z=624.5(M+H)⁺

ESI(-)-MS m/z= 622.5 (M-H)⁻, 668.5 (M+HCOO)⁻

[0132] [ラクトース含有化合物(Ia)の合成]

得られたLyso-lactosyl-ceramide 5.0mg (8.0 μmol)をDMF3mLに溶かし、攪拌しながらあらかじめN-ヒドロキシこはく酸イミド、ジシクロヘキシルカルボジイミドで活性化させたチオオクト酸5.0mg (16.0 μmol)を含むDMF溶液2mLを加え室温で24時間反応させた。反応液は濃縮した後、ODSカラムクロマトグラフィーで精製した。その結果、化合物(Ia)を収率71% (4.6mg)で得た。

[0133] ¹H-NMR(600MHz, CD₃OD): δ 5.642(dt, 1H, -CH(OH)-CH=CH-CH₂-, J=6.6Hz, 15.4Hz), 5.444(dd, 1H, -CH(OH)-CH=CH-CH₂-, J=7.7Hz, 15.4Hz), 4.354(d, 1H, Gal H-1, J=7.7Hz), 4.302(d, 1H, Glc H-1, J=7.7Hz), 4.16-4.14(m, 1H, -O-CH₂-CH(NH-), 4.073(t, 1H, -CH(NH-)-CH(OH)-, J=7.7Hz), 3.98-3.97(m, 1H, -CH(NH-)-CH(OH)-), 3.898(brd, 1H, Glc H-6, J=12.1Hz), 3.833(dd, 1H, Glc H-6', J=4.4Hz, 12.1Hz), 3.806(d, 1H, Gal H-4, J=3.3Hz), 3.770(dd, 1H, Gal H-6, J=7.5Hz, 11.6Hz), 3.692(dd, 1H, Gal H-6', J=4.6Hz, 11.6Hz), 3.60-3.51(m, 6H, Glc H-3, H-4, Gal H-2, H-5, -Glc-O-CH₂-CH(NH-), CH₂-CH(S-), 3.471(dd, 1H, Gal H-3, J=3.3Hz, 9.5Hz), 3.43-3.40(m, 1H, Glc H-5), 3.28(overlap, 1H, Glc H-2), 3.19-3.15(m, 1H, -CH₂-CH₂-S-), 3.12-3.07(m, 1H, -CH₂-CH₂-S-), 2.49-2.43(m, 1H, -CH₂-CH₂-S-), 2.21-2.16(m, 2H, -C(O)-CH₂-CH₂-), 2.04-2.00(br, 2H, -CH=CH-CH₂-CH₂-), 1.91-1.85(m, 1H, -CH₂-CH₂-S-), 1.75-1.57, 1.50-1.41(2xm, 6H, N-thioctyl),

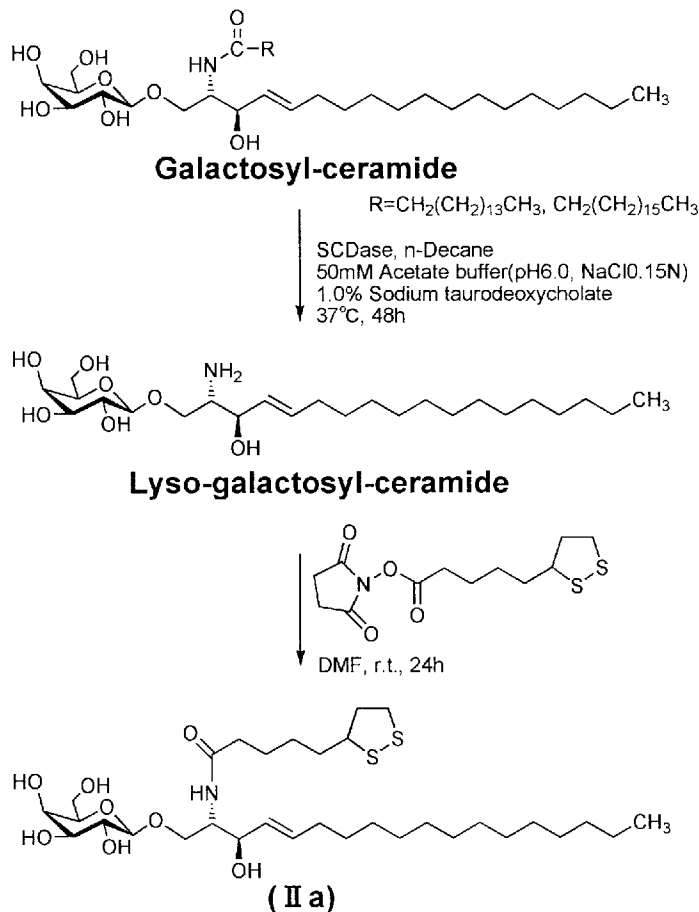
1.39–1.25 (m, 22H, $-(\text{CH}_2)_n-$), 0.891(t, 3H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, 7.0Hz).

ESI(+)-MS $m/z=812.6(\text{M}+\text{H})^+$

ESI(-)-MS $m/z=810.7(\text{M}-\text{H})^-$, 856.6($\text{M}+\text{HCOO})^-$

実施例 2

[0134]



[0135] [ガラクトース含有化合物(IIa)の合成]

上記の方法と同様にして得られたLyso-galactosyl-ceramide 5.0mg (10.8 μmol)をDMF 3mLに溶かし、攪拌しながらあらかじめN-ヒドロキシコハク酸イミド、ジシクロヘキシルカルボジイミドで活性化させたチオオクト酸5.0mg (16.0 μmol)を含むDMF溶液2mLを加え室温で24時間反応させた。反応液は濃縮した後、ODSカラムクロマトグラフィーで精製した。その結果、化合物(Ia)を収率80% (5.5mg)で得た。

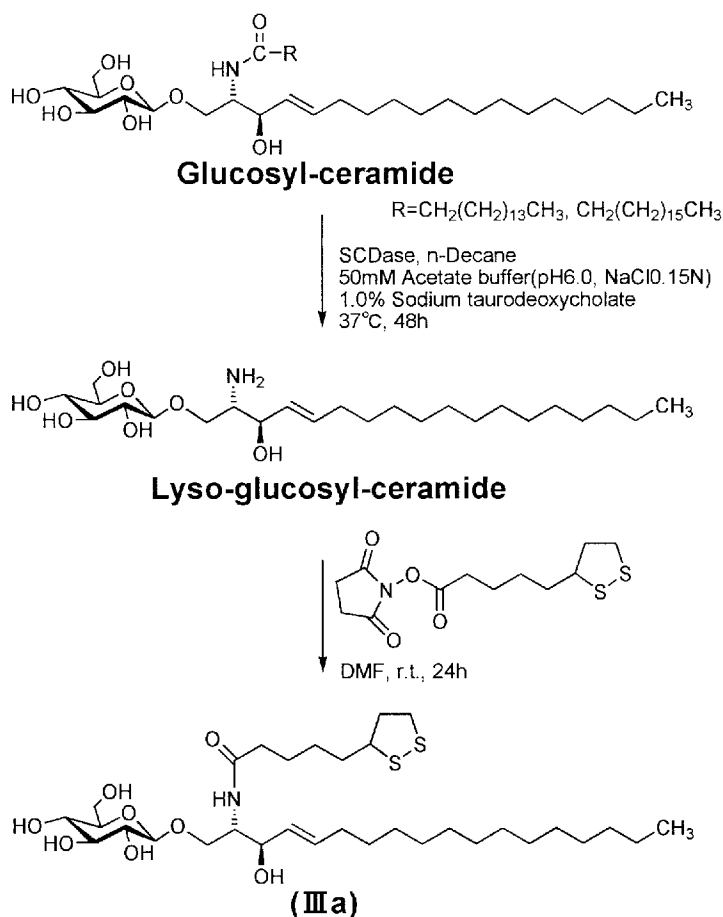
[0136] $^1\text{H-NMR}$ (600MHz, CD_3OD): δ 5.680(dt, 1H, $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$, $J=6.6\text{Hz}$, 15.4Hz), 5.465(dd, 1H, $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$, $J=7.7\text{Hz}$, 15.4Hz), 4.230(d, 1H, H-1, $J=7.6\text{Hz}$), 4.16–4.13(m, 1H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}-)$), 4.048(t, 1H, $-\text{CH}(\text{NH}-)-\text{CH}(\text{O})$

H)-, $J=7.7\text{Hz}$), 4.00–3.97(m, 1H, $-\text{CH}(\text{NH}-)\text{CH}(\text{OH})-$), 3.830(brd, 1H, H-4, $J=3.4\text{Hz}$), 3.780(dd, 1H, H-6, $J=6.9\text{Hz}$, 11.4Hz), 3.724(dd, 1H, H-6', $J=5.2\text{Hz}$, 11.3Hz), 3.65–3.61(m, 1H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}-)-$), 3.60–3.50(m, 3H, H-2, H-5, $\text{CH}_2-\text{CH}(\text{S}-)-$), 3.480(dd, 1H, H-3, $J=3.3\text{Hz}$, 9.7Hz), 3.19–3.15(m, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$), 3.12–3.08(m, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$), 2.48–2.45(m, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$), 2.21–2.18(m, 2H, $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 2.05–2.01(br, 2H, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.91–1.87(m, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$), 1.73–1.61, 1.49–1.44(2xm, 6H, N-thiooctyl), 1.39–1.28 (m, 22H, $-(\text{CH}_2)-$), 0.898(t, 3H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, 7.0Hz).

ESI(+)-MS $m/z=650.3(\text{M}+\text{H})^+$

ESI(-)-MS $m/z=648.3(\text{M}-\text{H})^-$, $694.4(\text{M}+\text{HCOO})^-$

[0137] [比較例1]



[0138] [グルコース含有化合物(IIIa)の合成]

上記の方法と同様にして得られたLyso-glucosyl-ceramide 5.0mg ($10.8\text{ }\mu\text{mol}$)をDM

F3mLに溶かし、攪拌しながらあらかじめN-ヒドロキシコハク酸イミド、ジシクロヘキシルカルボジイミドで活性化させたチオオクト酸5.0mg (16.0 μ mol)を含むDMF溶液2mLを加え室温で24時間反応させた。反応液は濃縮した後、ODSカラムクロマトグラフィーで精製した。その結果、化合物(Ia)を収率77% (5.4mg)で得た。

- [0139] $^1\text{H-NMR}$ (600MHz, CD_3OD): δ 5.696(dt, 1H, $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$, $J=6.6\text{Hz}$, 15.4Hz), 5.466(dd, 1H, $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$, $J=7.7\text{Hz}$, 15.4Hz), 4.270(d, 1H, H-1, $J=7.7\text{Hz}$), 4.14-4.11(m, 1H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}-)-$), 4.0874 (t, 1H, $-\text{CH}(\text{NH}-)-\text{CH}(\text{OH})-$, $J=7.7\text{Hz}$), 4.01-3.98(m, 1H, $-\text{CH}(\text{NH}-)-\text{CH}(\text{OH})-$), 3.898(brd, 1H, H-6, $J=10.6\text{Hz}$), 3.68-3.62(m, 2H, H-5, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}-)-$), 3.60-3.56(m, 1H, $\text{CH}_2-\text{CH}(\text{S})-$), 3.40-3.50(m, 1H, H-3), 3.29-3.27(m, 2H, H-4, H-6'), 3.23-3.20(m, 1H, H-2), 3.19-3.16(m, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$), 3.12-3.08(m, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$), 2.48-2.45(m, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$), 2.21-2.18(m, 2H, $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 2.05-2.01(br, 2H, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.91-1.85(m, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$), 1.75-1.57, 1.50-1.41(2xm, 6H, N-thioctyl), 1.39-1.25 (m, 22H, $-(\text{CH}_2)-$), 0.896(t, 3H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, 7.0Hz).
ESI(+)-MS $m/z=650.4(\text{M}+\text{H})^+$
ESI(-)-MS $m/z=648.3(\text{M}-\text{H})^-$, 694.3($\text{M}+\text{HCOO}$) $^-$

[0140] <SPRセンサーによるリシン60およびリシン120の検出>

(センサーチップの作成)

Biacore社より市販されているSIA kit Auの金基板をオゾンクリーナーで洗浄し、実施例1で合成した化合物(Ia) 100nmolを溶解させたメタノール溶液2mLに室温で24時間浸漬した。その後、メタノール、水の順で3回洗浄してセンサーチップ(1a)を作成した。また、上記と同様な方法で実施例2の化合物(IIa)、比較例1の化合物(IIIa)を用いて、それぞれセンサーチップ(2a)、センサーチップ(3a)を作成した。

[0141] (SPR測定)

得られたセンサーチップに対するリシン60およびリシン120の特異的吸着の特性を計測するため、実施例1の化合物(Ia)を固定化したセンサーチップ(1a)を市販の表面プラズモン共鳴バイオセンサー(Biacore2000、Biacore社製)に装着して、設定温度25°C、流速10 μ L/minでHEPES(10mM、pH:7.5、NaCl:0.15M)緩衝液を流した。

計測前にセンサーグラムが安定したことを確認した。

[0142] 次に、リシン60 (*Ricinus communis* agglutinin 60、ホーネン製) およびリシン120 (*Ricinus communis* agglutinin 120、和光純薬製) を用いて、HEPES (10mM、pH:7.5、NaCl:0.15M) 緩衝液で1 μ g/mLに調製した。リシン溶液は流速10 μ L/min で100 μ Lインジェクトした。同様にして、実施例2の化合物 (IIa)、比較例1の化合物 (IIIa) をそれぞれ固定化したセンサーチップ (2a)、センサーチップ (3a) も測定した。

[0143] その結果をリシン60について図1およびリシン120について図2に示す。リシン60の検出強度は、実施例1の化合物 (Ia) で1400RU、実施例2の化合物 (IIa) で65RU、比較例1の化合物 (IIIa) で53RUであった。また、リシン120の検出強度は、実施例1の化合物 (Ia) で1642RU、実施例2の化合物 (IIa) で1217RU、比較例1の化合物 (I IIa) で118RUであった。なお、「RU」は「Resonance unit」の略で、基盤表面に物質が吸着、付着、固定化されると、その量に応じて値が増大することを意味する。Biacore社によると1RU=約1pg/mm²である。

[0144] この結果から、リシン60に対しては実施例1の化合物 (Ia) を固定化したセンサーチップ (1a) のみが強いシグナルを示し、リシン120に対しては実施例1の化合物 (Ia) を固定化したセンサーチップ (1a) および実施例2の化合物 (IIa) を固定化したセンサーチップ (2a) が強いシグナルを示した。すなわち、センサーチップ上に化合物 (Ia) および化合物 (IIa) を固定化すれば、特異的かつ高感度にリシン60およびリシン120を検出できることを示唆している。

[0145] (リシン60およびリシン120の各種濃度におけるSPR測定)

実施例1の化合物 (Ia) を固定化したセンサーチップ (1a) を上記と同様の方法で表面プラズモン共鳴バイオセンサー (Biacore2000、Biacore社製) に装着して、設定温度25℃、流速10 μ L/minでHEPES (10mM、pH:7.5、NaCl:0.15M) 緩衝液を流した。計測前にセンサーグラムが安定したことを確認した。

[0146] 測定は、リシン60 (*Ricinus communis* agglutinin 60、ホーネン製) およびリシン120 (*Ricinus communis* agglutinin 120、和光純薬製) を用い、HEPES (10mM、pH:7.5、NaCl:0.15M) 緩衝液でそれぞれ0.01 μ g/mL、0.1 μ g/mL、1 μ g/mLおよび10 μ g/mLに調製した。リシン溶液は流速10 μ L/min で100 μ Lインジェクトした。化合物 (Ia) を

固定化したセンサーチップ(1a)について、結果を図3(リシン60)、図6(リシン120)に示す。

同様に、実施例2の化合物(IIa)を固定化したセンサーチップ(2a)についても測定した。その結果を図4(リシン60)、図7(リシン120)に示す。さらに、比較例1の化合物(IIIa)を固定化したセンサーチップ(3a)についても測定した。その結果を図5(リシン60)、図8(リシン120)に示す。

[0147] その結果、図3～図5に示すように、リシン60に対しては実施例1の化合物(Ia)を固定化したセンサーチップ(1a)のみが強いシグナルを示し、その検出限界は約1ng/mLであると推測される。また、図6～図8に示すように、リシン120に対しては実施例1の化合物(Ia)を固定化したセンサーチップ(1a)および実施例2の化合物(IIa)を固定化したセンサーチップ(2a)が強いシグナルを示し、その検出限界はともに約0.1ng/mLであると推測される。このことは、極微量(1ng程度)のリシンでも、前処理あるいは標識物質を用いなくて、高感度に検出できることを意味している。

[0148] (結合定数の算出)

上記SPR測定結果から、結合定数を求める最適な条件を推定した。すなわち、実施例1の化合物(Ia)を固定化したセンサーチップ(1a)を表面プラズモン共鳴バイオセンサーに装着して、設定温度25℃、流速30 μ L/minのHEPES(10mM、pH:7.5、NaCl:0.15M)緩衝液を流した。計測前にセンサーグラムが安定したことを確認した。結合定数はリシン60(Ricinus communis agglutinin 60、ホーネン製)およびリシン120(Ricinus communis agglutinin 120、和光純薬製)を用い、HEPES(10mM、pH:7.5、NaCl:0.15M)緩衝液で調製した。リシン濃度は、強いシグナルが得られる場合は、0.1 μ g/mL、0.5 μ g/mL、0.75 μ g/mLおよび1 μ g/mLに調製し、弱いシグナルの場合では、10 μ g/mL、50 μ g/mL、75 μ g/mLおよび100 μ g/mLに調製した。実施例2の化合物(IIa)を固定化したセンサーチップ(2a)、比較例1の化合物(IIIa)を固定化したセンサーチップ(3a)についても同様な方法で行った。得られたセンサーグラムから1:1反応の結合定数を求めた結果をリシン60については表1に、リシン120については表2に示す。

[0149] リシン60に対する解離定数(K_D)は、センサーチップ(1a)で 6.7×10^{-10} M、リシン12

0に対する解離定数(K_D)は、センサーチップ(1a)で 4.7×10^{-11} M、センサーチップ(2a)で 1.0×10^{-10} Mであり、非常に強い結合をしていることがわかる。この効果はスフィンゴシン塩基などの側鎖部位の自己組織化機能により、高度な配向性と高密度な固定化が行なわれ、複数の近接する糖鎖部位が効率よくリシンを強く結合させるためである。さらに、センサーチップ(1a)およびセンサーチップ(2a)を用いてあらかじめノイズと判定する基準、すなわち標準数値を設定しておくことで、十分な確度を持って高感度なリシンの定性および定量が可能となる。

[0150] [表1]

リシン 6 0	結合速度定数 k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	解離速度定数 k_d (s^{-1})	解離定数 K_D (M)
実施例1 センサーチップ (1 a)	1.4×10^6	1.1×10^{-3}	6.7×10^{-10}
実施例2 センサーチップ (2 a)	7.0×10^3	3.1×10^{-3}	2.3×10^{-6}
比較例1 センサーチップ (3 a)	3.1×10^3	3.8×10^{-2}	8.2×10^{-4}

[0151] [表2]

リシン 1 2 0	結合速度定数 k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	解離速度定数 k_d (s^{-1})	解離定数 K_D (M)
実施例1 センサーチップ (1 a)	6.5×10^5	3.1×10^{-5}	4.7×10^{-11}
実施例2 センサーチップ (2 a)	6.3×10^6	6.5×10^{-4}	1.0×10^{-10}
比較例1 センサーチップ (3 a)	1.2×10^4	4.1×10^{-3}	3.3×10^{-7}

[0152] (SPRセンサーによる各種タンパク質の検出試験)

得られたセンサーチップに対するリシン60およびリシン120の特異性を評価するために、各種タンパク質を用いた検出試験を行なった。実施例1の化合物(1a)を固定化したセンサーチップ(1a)を市販の表面プラズモン共鳴バイオセンサー(Biacore2000、Biacore社製)に装着して、設定温度25℃、流速 $10 \mu L/min$ でHEPES(10mM、pH:7.5、NaCl:0.15M)緩衝液を流した。計測前にセンサーグラムが安定したことを確認した。

[0153] 次に、下記に示す各種タンパク質を用いて、HEPES(10mM、pH:7.5、NaCl:0.15M

）緩衝液で10 μ g/mLに調製した。リシン溶液は流速10 μ L/min で10 μ Lインジェクトした。同様にして、実施例2の化合物(IIa)、比較例1の化合物(IIIa)をそれぞれ固定化したセンサーチップ(2a)、センサーチップ(3a)も測定した。

[0154] [試験に用いたタンパク質]

リシン60: Ricinus communis agglutinin 60、ホーネン製

リシン120: Ricinus communis agglutinin 120、和光純薬製

アルブミン: Albumin from bovine serum、SIGMA製

グロブリン: γ -Globulins from bovine blood、SIGMA製

ConA: Canavalia ensiformis(jack bean)、和光純薬製

SBA: Glycine max(soybean, soya bean)、和光純薬製

PNA: Arachis hypogaea(peanuts)、和光純薬製

MPL: Maclura pomifera(osage orange tree)、Vector製

MAM: Maackia amurensis、生化学工業製

SSA: Sambucus sieboldiana、生化学工業製

[0155] 測定結果を図9に示す。実施例1の化合物(Ia)を固定化したセンサーチップ(1a)ではリシン60およびリシン120に対してのみ強いシグナルを示し、実施例2の化合物(IIa)を固定化したセンサーチップ(2a)ではリシン120に対してのみ強いシグナルを示した。その他のタンパク質においては、小さなシグナルを検出したものの、標準数居値を設定しておくことで、ノイズレベルで処理される程度であった。

[0156] ＜金微粒子を用いた検出試薬によるリシン60およびリシン120の検出＞

(金微粒子を用いた検出試薬の調製)

粒子径20nmの金微粒子分散溶液(SIGMA製: 微粒子濃度: 5.0×10^{11} 個/mL) 500 μ Lを十分に超音波処理したのち、0～10 μ gの実施例1の化合物(Ia)を溶解させた100 μ Lメタノール溶液を攪拌しながら添加し、50℃で1時間、固定化反応した。この間、化合物(Ia)添加直後から金微粒子分散溶液の色調は変化し、その変化は添加濃度によって異なった。分散安定性の結果は、金微粒子分散溶液の色調変化から目視にて評価した。同様にして、実施例2の化合物(IIa)および比較例1の化合物(IIIa)についても行なった。ここで、分散安定性結果は化合物(Ia)～(IIIa)を固定した1時間

後の結果である。

[0157] 表3の結果から、添加した化合物量が $1.5\mu\text{g}$ 以下の場合、金微粒子表面で構築される自己組織化膜を形成するための十分な化合物量に達しないことで、金微粒子表面の疎水性が増加したことによる分散安定性の低下が確認できた。また、添加した化合物量が $5.0\mu\text{g}$ 以上の場合、過剰に添加した化合物がリシンとの凝集反応を阻害するため、取り除く必要がある。したがって、簡便かつ分散安定性に優れた検出試薬を調製するためには、粒子径 20nm の金微粒子(SIGMA製:微粒子濃度: 5.0×10^{11} 個/mL)分散溶液 $500\mu\text{L}$ 当たりの最適固定化量は $2.0\mu\text{g}\sim 2.5\mu\text{g}$ と決定した。

[0158] [表3]

添加量	分散安定性		
	実施例1 化合物(I a)	実施例2 化合物(II a)	比較例1 化合物(III a)
$0.1\mu\text{g}$	○	○	○
$0.2\mu\text{g}$	○	○	○
$0.3\mu\text{g}$	△	△	△
$0.4\mu\text{g}$	△	△	△
$0.5\mu\text{g}$	×	△	△
$1.0\mu\text{g}$	×	×	×
$1.5\mu\text{g}$	△	△	△
$2.0\mu\text{g}$	△	○	○
$2.5\mu\text{g}$	○	○	○
$5.0\mu\text{g}$	○	○	○
$7.5\mu\text{g}$	○	○	○
$10.0\mu\text{g}$	○	○	○

×：凝集 △：若干凝集 ○：良好

(検出試薬によるリシン60、リシン120の判定試験)

[0159] 粒子径 20nm の金微粒子分散溶液(SIGMA製:微粒子濃度: 5.0×10^{11} 個/mL) $5000\mu\text{L}$ を十分に超音波処理したのち、 $25\mu\text{g}$ の化合物(Ia)を溶解させた $500\mu\text{L}$ メタノール溶液を攪拌しながら添加、 50°C で1時間、固定化反応して化合物(Ia)固定化の金微粒子分散溶液:試薬(1b)を調製した。同様にして、実施例2の化合物(IIa)固定化の金微粒子分散溶液:試薬(2b)および比較例1の化合物(IIIa)固定化の金微粒子分散溶液:試薬(3b)についても調製した。

[0160] 次に、得られた試薬(1b)～(3b) 200 μ Lにリシン60 (Ricinus communis agglutinin 60、ホーネン製)をHEPES(10mM、pH:7.5、NaCl:0.15N)緩衝液で調製した10 μ g/mL溶液を100 μ L添加、室温で一定時間静置した。各時間における金微粒子分散溶液の色調変化を目視にて評価した。

[0161] 10分後の結果を図10および表4に示す。試薬(1b)ではリシン60およびリシン120に対して強い色調変化を示し、試薬(2b)ではリシン120に対してのみ強い色調変化を示した。また、添加後1時間まで観察したが、10分後以降大きな変化は認められなかった。したがって、試薬(1b)、試薬(2b)を用いることで、短時間(10分間)かつ簡便にリシンを検出できることが認められた。

[0162] [表4]

リシン \ 試薬	実施例1 試薬(1b)	実施例2 試薬(2b)	比較例1 試薬(3b)
リシン60	++	—	—
リシン120	++	++	—

—：検出できず ±：弱い検出 +：検出 ++：強い検出

[0163] (検出試薬によるリシン60の検出限界濃度試験)

上記の方法によって調製した試薬(1b)～(3b) 200 μ Lにリシン60 (Ricinus communis agglutinin 60、ホーネン製)をHEPES(10mM、pH:7.5、NaCl:0.15N)緩衝液で調製した1.0～50 μ g/mL溶液を100 μ L添加、室温で一定時間静置した。各時間における金微粒子分散溶液の色調変化を目視にて評価した。

[0164] 試薬(1b)、試薬(2b)および試薬(3b)の結果を、それぞれ、表5、表6、および表7に示す。この結果から、リシン60に対しては試薬(1b)のみ変化し、検出限界濃度は時間に依存していることがわかった。検出時間10分間における限界濃度は約5 μ g/mLであった。

[0165] [表5]

時間 (min) 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	0	2	4	6	8	10	20	30
0	—	—	—	—	—	—	—	—
1	—	—	—	—	—	—	—	±
5	—	—	—	±	±	+	++	++
10	—	—	±	+	+	++	++	++
25	—	±	+	++	++	++	++	++
50	—	±	+	++	++	++	++	++

— : 検出できず ± : 弱い検出 + : 検出 ++ : 強い検出

[0166] [表6]

時間 (min) 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	0	2	4	6	8	10	20	30
0	—	—	—	—	—	—	—	—
1	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—
25	—	—	—	—	—	—	—	—
50	—	—	—	—	—	—	—	—

— : 検出できず ± : 弱い検出 + : 検出 ++ : 強い検出

[0167] [表7]

時間 (min) 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	0	2	4	6	8	10	20	30
0	—	—	—	—	—	—	—	—
1	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—
25	—	—	—	—	—	—	—	—
50	—	—	—	—	—	—	—	—

— : 検出できず ± : 弱い検出 + : 検出 ++ : 強い検出

[0168] (検出試薬によるリシン120の検出限界濃度試験)

上記の方法によって調製した試薬(1b)～(3b) 200 μL にリシン120(Ricinus communis agglutinin 120、和光純薬)をHEPES(10mM、pH:7.5、NaCl:0.15N)緩衝液で調製した1.0～50 $\mu\text{g/mL}$ 溶液を100 μL 添加、室温で一定時間静置した。各時間における金微粒子分散溶液の色調変化を目視にて評価した。

試薬(1b)、試薬(2b)および試薬(3b)の結果を、それぞれ、表8、表9、および表10に示す。この結果から、リシン120に対しては試薬(1b)試薬(2b)のみ変化し、検出限界濃度は時間に依存していることがわかった。検出時間10分間における限界濃度は約5 $\mu\text{g/mL}$ であった。

[0169] [表8]

時間 (min) 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	0	2	4	6	8	10	20	30
0	—	—	—	—	—	—	—	—
1	—	—	—	—	—	±	±	±
5	—	—	±	±	±	+	++	++
10	—	—	±	+	+	++	++	++
25	—	±	+	++	++	++	++	++
50	—	±	+	++	++	++	++	++

— : 検出できず ± : 弱い検出 + : 検出 ++ : 強い検出

[0170] [表9]

時間 (min) 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	0	2	4	6	8	10	20	30
0	—	—	—	—	—	—	—	—
1	—	—	—	—	—	—	±	±
5	—	—	—	±	±	+	++	++
10	—	—	±	+	+	++	++	++
25	—	±	+	++	++	++	++	++
50	—	±	+	++	++	++	++	++

— : 検出できず ± : 弱い検出 + : 検出 ++ : 強い検出

[0171] [表10]

時間 (min) 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	0	2	4	6	8	10	20	30
0	—	—	—	—	—	—	—	—
1	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—
25	—	—	—	—	—	—	—	—
50	—	—	—	—	—	—	—	—

— : 検出できず ± : 弱い検出 + : 検出 ++ : 強い検出

[0172] (検出試薬による各種タンパク質の検出試験)

得られた検出試薬に対するリシン60およびリシン120の特異性を評価するために、各種タンパク質を用いた検出試験を行なった。得られた試薬(1b)～(3b) 200 μ Lに下記に示す各種タンパク質をHEPES(10mM、pH:7.5、NaCl:0.15N)緩衝液で調製し、10 μ g/mL溶液を100 μ L添加、室温で一定時間静置した。各時間における金微粒子分散溶液の色調変化を目視にて評価した。

[0173] ここで用いたタンパク質は以下の通りである。

リシン60: Ricinus communis agglutinin 60、ホーネン製

リシン120: Ricinus communis agglutinin 120、和光純薬製

アルブミン: Albumin from bovine serum、SIGMA製

グロブリン: γ -Globulins from bovine blood、SIGMA製

ConA: Canavalia ensiformis(jack bean)、和光純薬製

SBA: Glycine max(soybean, soya bean)、和光純薬製

PNA: Arachis hypogaea(peanuts)、和光純薬製

MPL: Maclura pomifera(osage orange tree)、Vector製

MAM: Maackia amurensis、生化学工業製

SSA: Sambucus sieboldiana、生化学工業製

[0174] 10分後の結果を図11に示す。試薬(1b)ではリシン60およびリシン120に対してのみ強い色調変化を示し、試薬(2b)ではリシン120に対してのみ強い色調変化を示した。その他のタンパク質においては、殆ど変化が認められなかった。さらに、添加後1時間まで観察したが、すべての結果において10分後以降大きな変化は認められなかった。したがって、試薬(1b)、試薬(2b)はリシンに対して優れた特異性を有しており、短時間(10分間)かつ簡便にリシンを検出できることが認められた。さらに、試薬(1b)および試薬(2b)の組み合わせにより、タンパク質のホモロジーが極めて高いリシン60とリシン120の混合物でも、リシン60の有無を短時間で正確に検出できることが認められた。

[0175] [表11]

タンパク質 \ 試薬	実施例 1 試薬 (1 b)	実施例 2 試薬 (2 b)	比較例 1 試薬 (3 b)
リシン 60	++	-	-
リシン 120	++	++	-
アルブミン	-	-	-
グロブリン	-	-	-
ConA	-	-	-
SBA	-	-	-
PNA	-	-	-
MPL	-	-	-
MAM	-	-	-
SSA	-	-	-

- : 検出できず ± : 弱い検出 + : 検出 ++ : 強い検出

産業上の利用可能性

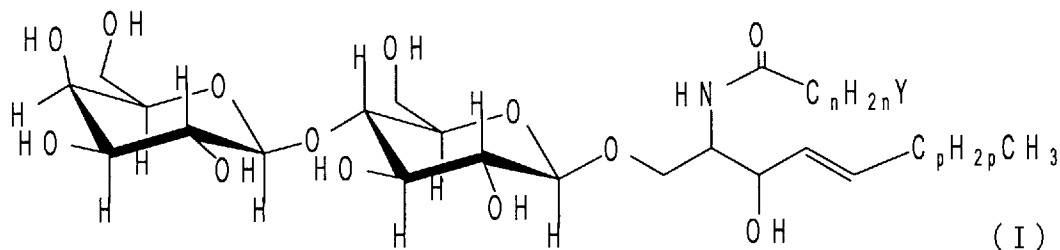
[0176] 本発明のリシン60の検出方法によれば、簡便かつ迅速に高い検出感度でリシン60を検出することができる。特に、リシン60とその2量体であるリシン120との混合物においても、リシン60を簡便かつ迅速に検出できる。

請求の範囲

[1] 下記の検出工程1、検出工程2および認定工程を含む、リシンの検出方法;

(1) 検出工程1:

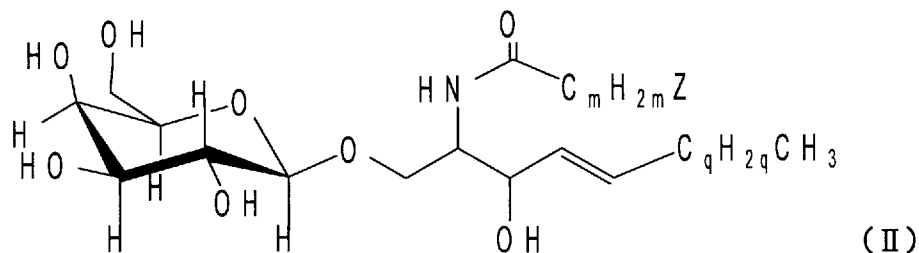
下記一般式(I)



[式中、nは2～20の整数を示し、Yは1個又は2個以上のチオール基または1個又は2個以上ジスルフィド基を有する基を示し;側鎖部位中のpは1～17の整数を示す。]で表されるラクトース含有化合物が、Yを介して基材1の表面に固定されている検出基材1の表面に、試験化合物を接触させ、検出基材1に結合した化合物を検出する工程、

(2) 検出工程2:

下記一般式(II)



[式中、mは2～20の整数を示し、Zは1個又は2個以上のチオール基または1個又は2個以上ジスルフィド基を有する基を示し;側鎖部位中のqは1～17の整数を示す。]で表されるガラクトース含有化合物が、Zを介して基材2の表面に固定されている検出基材2の表面に、前記検出工程1で用いたのと同じ試験化合物を接触させ、検出基材2に結合した化合物を検出する工程、

(3) 推定工程:

(a)前記検出工程1において、検出基材1の表面に結合した化合物が実質的に検出されない場合、試験化合物にリシン60が含有されていないと推定し;

(b)前記検出工程1において、検出基材1の表面に結合した化合物が実質的に検出され、前記検出工程2において、検出基材2の表面に結合した化合物が実質的に検出されない場合に、試験化合物にリシン60が含有されていると推定し；

(c)前記検出工程1および検出工程2において、検出基材1および2のいずれにおいても表面に結合した化合物が実質的に検出される場合、試験化合物にリシン120が含有されていると推定する。

[2] 検出工程1および／または検出工程2の前に、さらに試験化合物を分離精製する分離工程を含む、請求項1に記載の方法。

[3] 前記(3)推定工程において、(c)前記検出工程1および検出工程2において、検出基材1および2のいずれにおいても表面に結合した化合物が実質的に検出される場合、さらに前記分離工程を行い、該分離工程を経て得られた各化合物それぞれについて前記検出工程1および／または検出工程2を行う、請求項2に記載の方法。

[4] 前記分離精製した各化合物について、検出工程後の推定工程(3')が下記のとおりである、請求項2または3に記載の方法；

(a')前記検出工程1において、検出基材1の表面に結合した化合物が実質的に検出されない場合、該化合物はリシン60ではないと推定し；

(b')前記検出工程1において、検出基材1の表面に結合した化合物が実質的に検出され、前記検出工程2において、検出基材2の表面に結合した化合物が実質的に検出されない場合、該化合物はリシン60であると推定し；

(c') 前記検出工程1および検出工程2において、検出基材1および2のいずれにおいても表面に結合した化合物が実質的に検出される場合、該化合物はリシン60ではないと推定する。

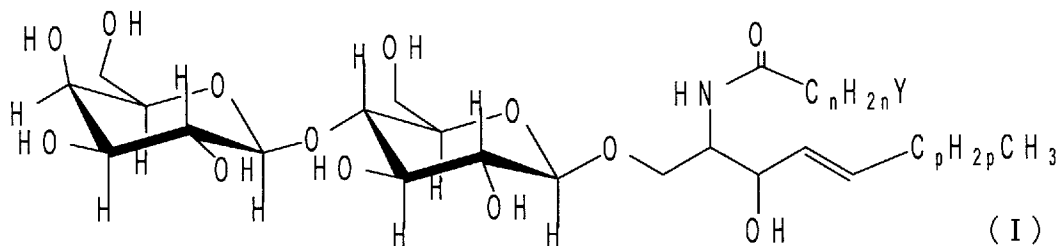
[5] 前記基材1および2がそれぞれ金属基板1および2であり、前記ラクトース含有化合物が金属基板1に固定された検出基材1がセンサーチップ1、前記ガラクトース含有化合物が金属基板2に固定された検出基材2がセンサーチップ2である、請求項1～4のいずれかに記載の方法。

[6] 前記ラクトース含有化合物および前記ガラクトース含有化合物が、それぞれ金属基板1および2に固定されたときの密度が $0.1 \sim 10 \text{ 個/nm}^2$ である、請求項5に記載の

方法。

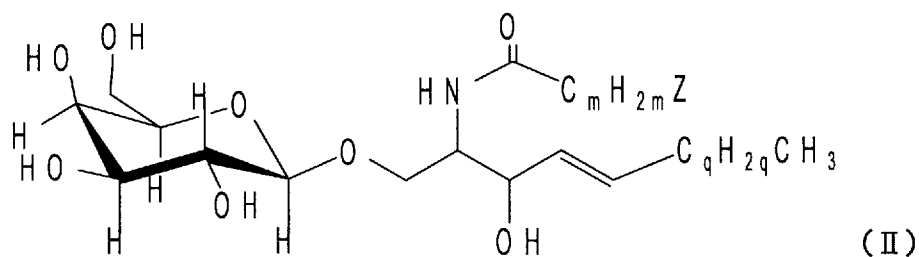
- [7] 前記金属基板1および2が、金基板である、請求項5または6に記載の方法。
- [8] 前記センサーチップがSPRセンサー用である、請求項5～7のいずれかに記載の方法。
- [9] 前記基材1および2がそれぞれ微粒子1および2であり、前記ラクトース含有化合物が該微粒子1に固定されたリシン検出用微粒子1、および前記ガラクトース含有化合物が該微粒子2に固定されたリシン検出用微粒子2が、それぞれ溶液中にコロイドで存在している、請求項1～4のいずれかに記載の方法。
- [10] 前記微粒子1および2の平均粒子径が、1～100nmの範囲にある、請求項9に記載の方法。
- [11] 前記微粒子1および2が、金属微粒子または半導体微粒子である、請求項9または10に記載の方法。
- [12] 下記検出基材1および下記検出基材2を含む、リシン検出用基材；

(1) 下記一般式(I)



[式中、nは2～20の整数を示し、Yは1個又は2個以上のチオール基または1個又は2個以上ジスルフィド基を有する基を示し；側鎖部位中のpは1～17の整数を示す。]
で表されるラクトース含有化合物が、Yを介して基材1の表面に固定された、検出基材1：

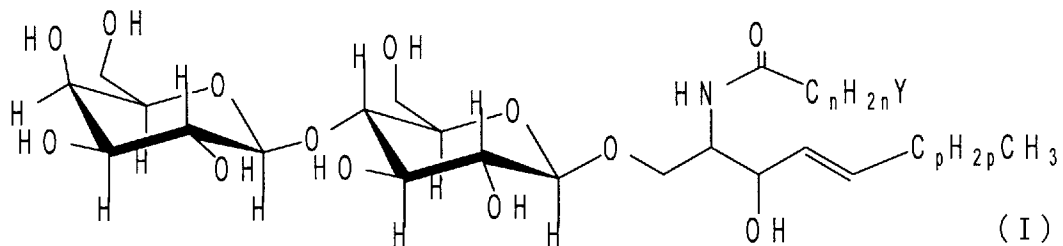
(2) 下記一般式(II)



[式中、 m は2～20の整数を示し、 Z は1個又は2個以上のチオール基または1個又は2個以上ジスルフィド基を有する基を示し；側鎖部位中の q は1～17の整数を示す。]で表されるガラクトース含有化合物が、 Z を介して基材2の表面に固定された、検出基材2。

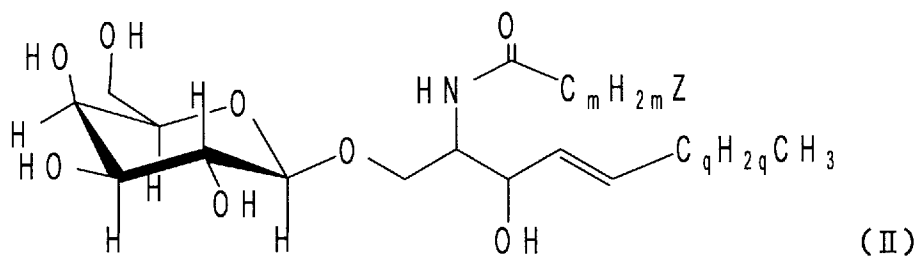
[13] 下記のセンサーチップ1およびセンサーチップ2を含む、リシン検出用センサーチップ；

(1) 下記一般式(I)



[式中、 n は2～20の整数を示し、 Y は1個又は2個以上のチオール基または1個又は2個以上ジスルフィド基を有する基を示し；側鎖部位中の p は1～17の整数を示す。]で表されるラクトース含有化合物が、 Y を介して金属基板1の表面に固定された、センサーチップ1；

(2) 下記一般式(II)



[式中、 m は2～20の整数を示し、 Z は1個又は2個以上のチオール基または1個又は2個以上ジスルフィド基を有する基を示し；側鎖部位中の q は1～17の整数を示す。]で表されるガラクトース含有化合物が、 Z を介して金属基板2の表面に固定された、センサーチップ2。

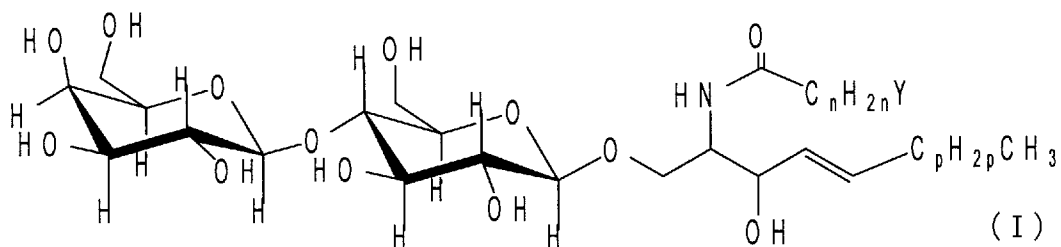
[14] 前記ラクトース含有化合物と前記ガラクトース含有化合物とが、同一の金属基板表面に固定されている、請求項13に記載のセンサーチップ。

[15] 前記ラクトース含有化合物および前記ガラクトース含有化合物が、それぞれ金属基

板1および2に固定されたときの密度が $0.1 \sim 10$ 個/ nm^2 である、請求項13または14に記載のセンサーチップ。

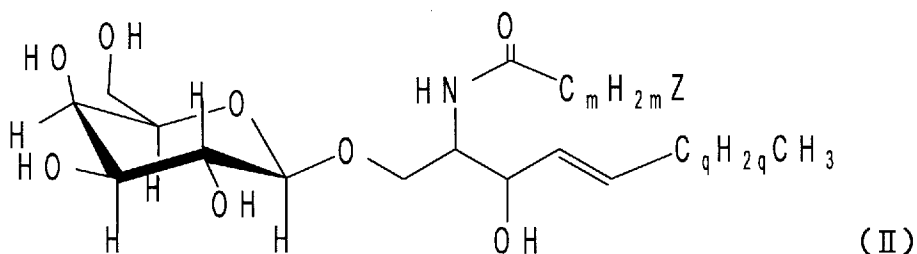
- [16] 前記金属基板1および2が、金基板である、請求項13～15のいずれかに記載のセンサーチップ。
- [17] 前記センサーチップがSPRセンサー用である、請求項13～16のいずれかに記載のセンサーチップ。
- [18] 下記検出試薬1および下記検出試薬2を含む、リシン検出用キット；

(1) 下記一般式(I)



[式中、 n は2～20の整数を示し、 Y は1個又は2個以上のチオール基または1個又は2個以上ジスルフィド基を有する基を示し；側鎖部位中の p は1～17の整数を示す。]で表されるラクトース含有化合物が、 Y を介して微粒子1の表面に固定された、リシン検出用微粒子1を含有する検出試薬1：

(2) 下記一般式(II)：



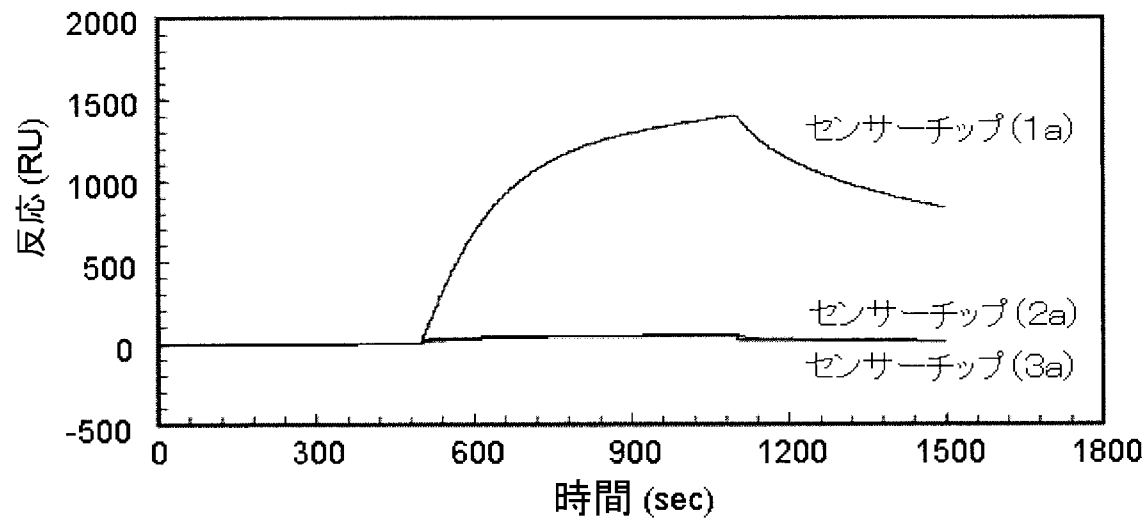
[式中、 m は2～20の整数を示し、 Z は1個又は2個以上のチオール基または1個又は2個以上ジスルフィド基を有する基を示し；側鎖部位中の q は1～17の整数を示す。]で表されるガラクトース含有化合物が、 Z を介して微粒子2の表面に固定された、リシン検出用微粒子2を含有する検出試薬2。

- [19] 前記検出試薬1および検出試薬2において、前記リシン検出用微粒子1およびリシン検出用微粒子2がそれぞれ溶液中にコロイドで存在している、請求項18に記載の

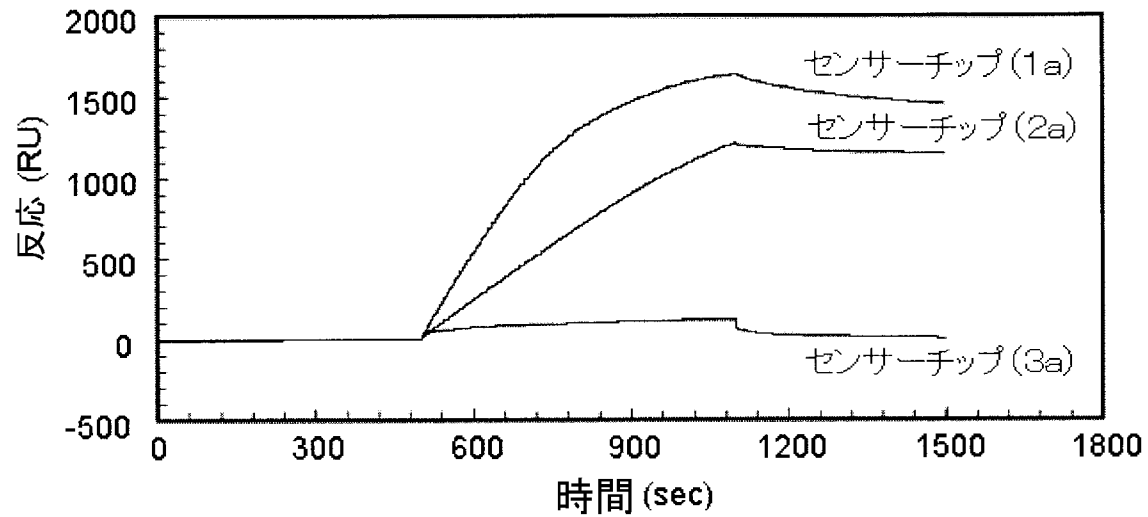
キット。

- [20] 前記微粒子1および2の平均粒子径が、1～100nmの範囲にある、請求項18または19に記載のキット。
- [21] 前記微粒子1および2が金属微粒子または半導体微粒子である、請求項18～20のいずれかに記載のキット。

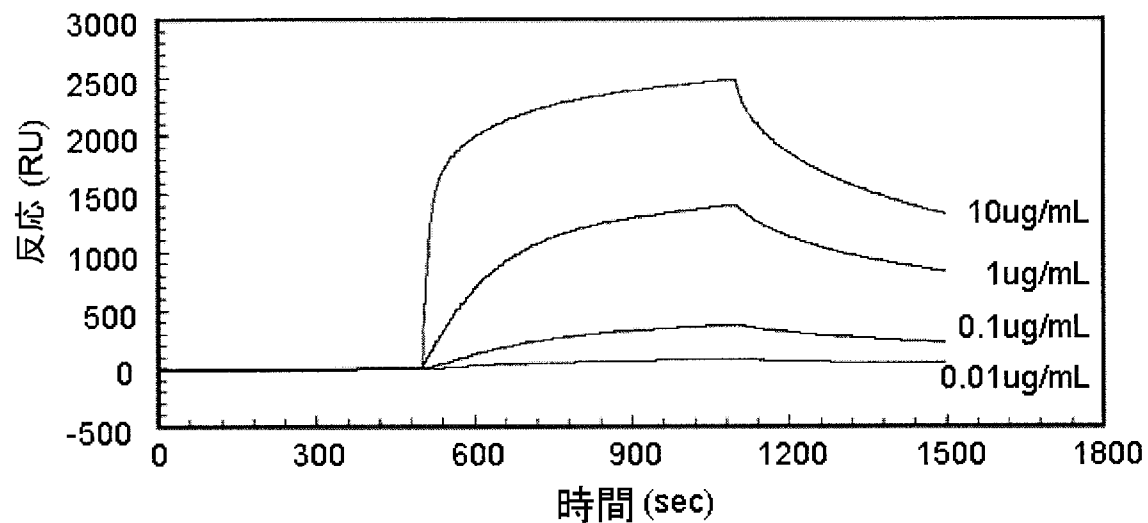
[図1]



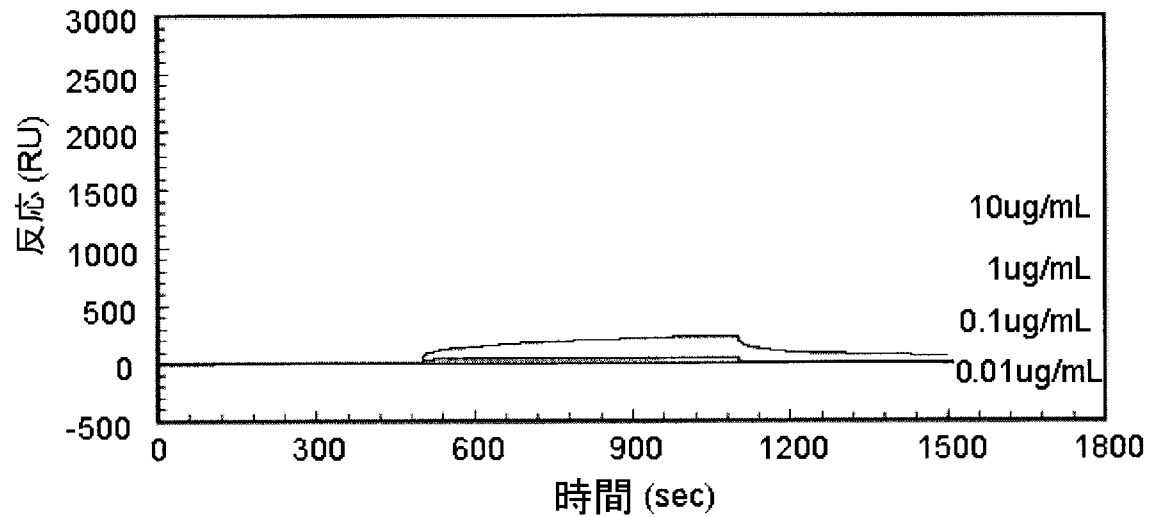
[図2]



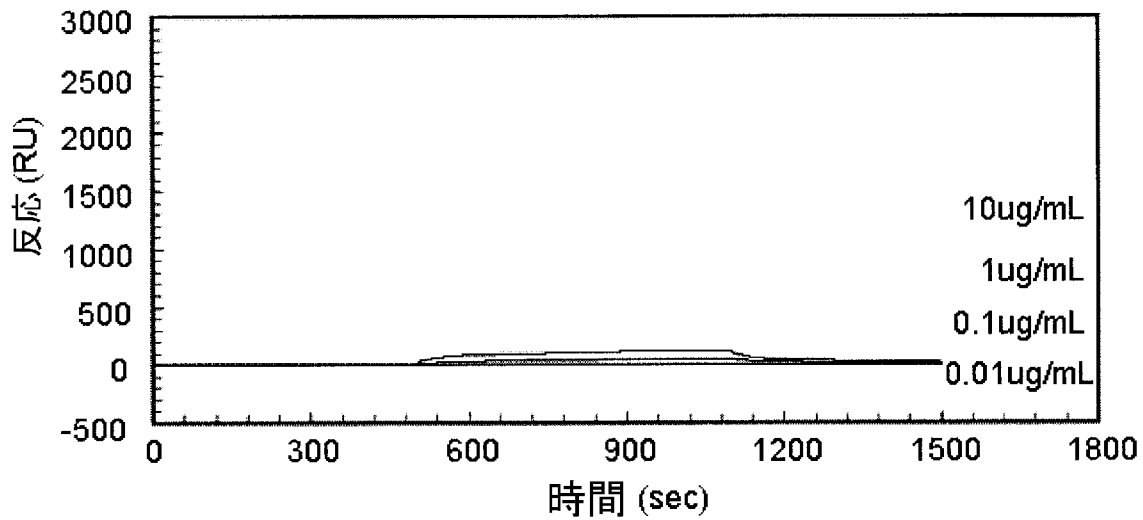
[図3]



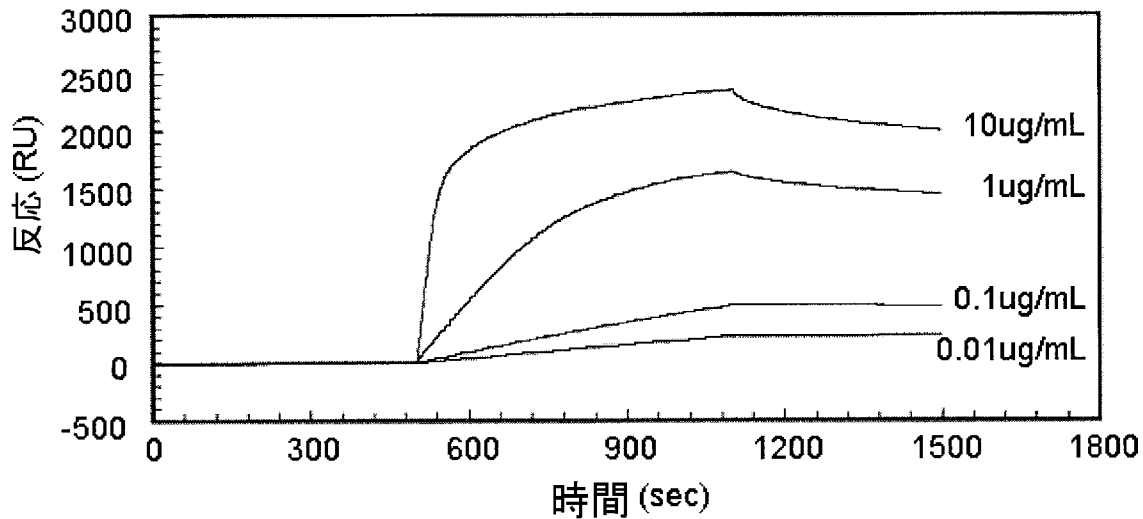
[図4]



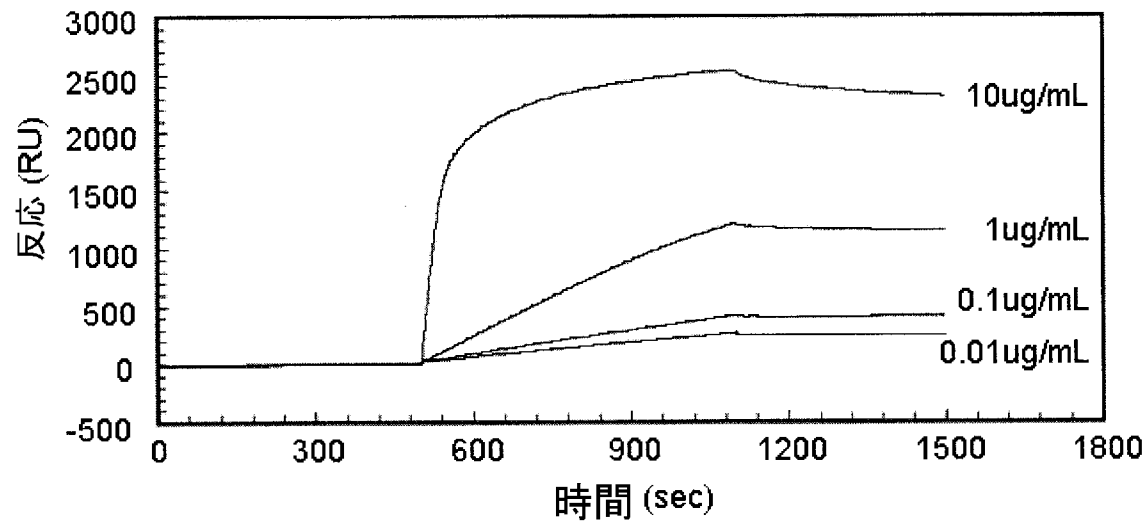
[図5]



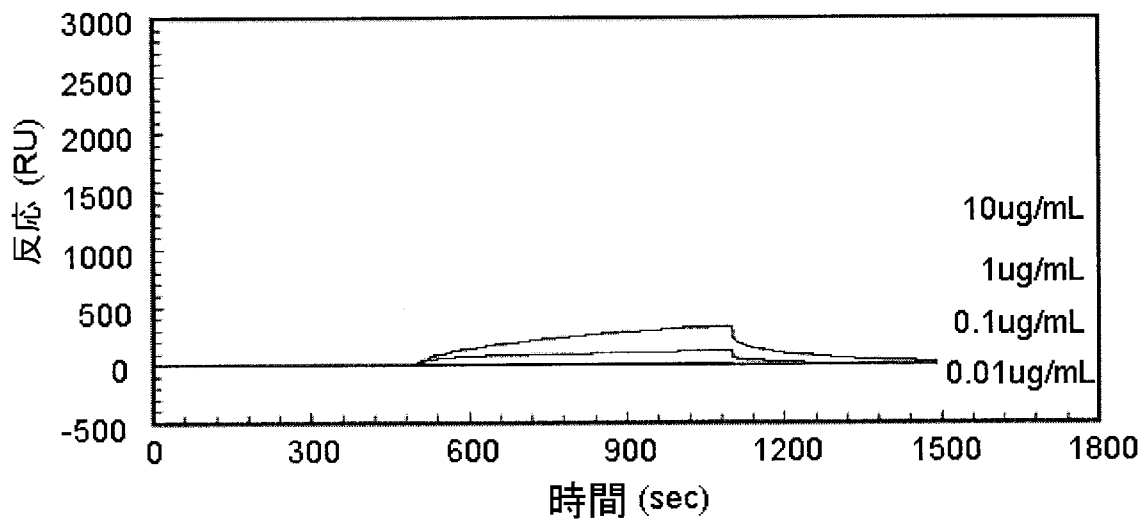
[図6]



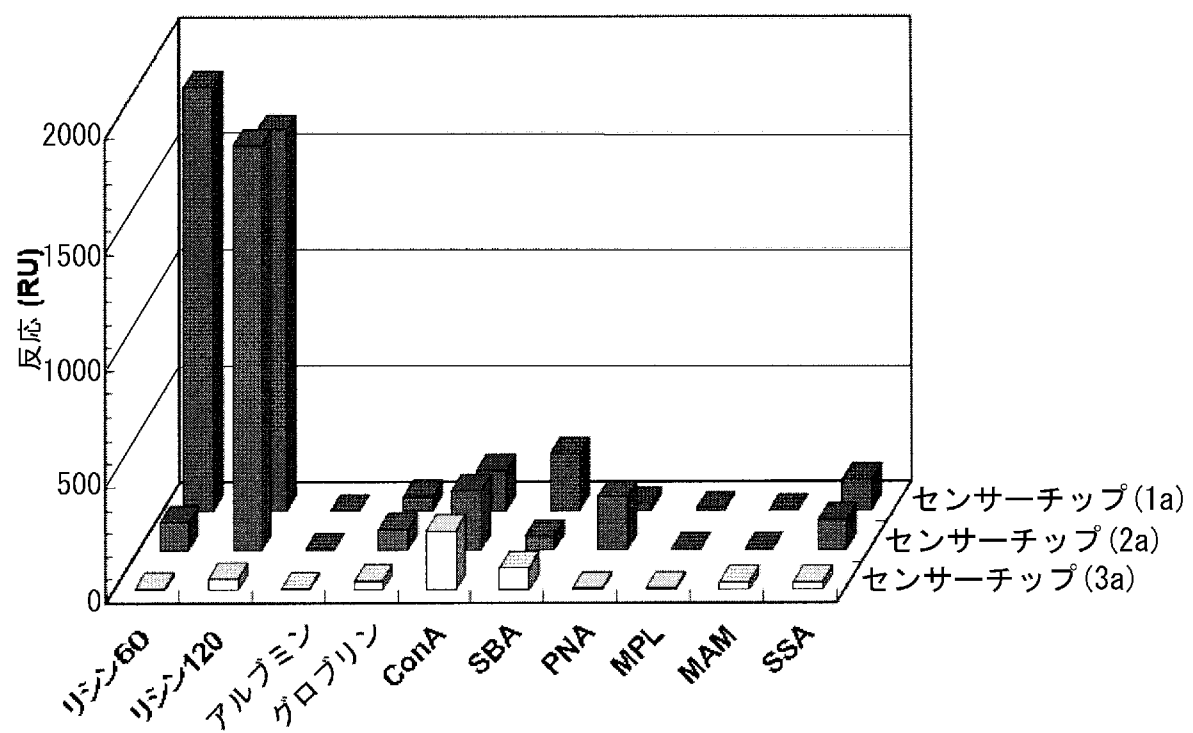
[図7]



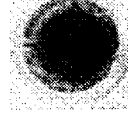
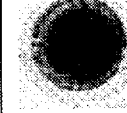
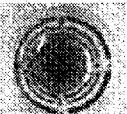
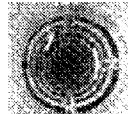
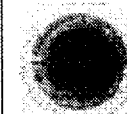
[図8]



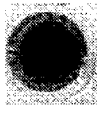
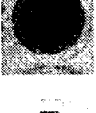
[図9]



[図10]

	試薬(1b)	試薬(2b)	試薬(3b)
リシン60	 ++	 —	 —
リシン120	 ++	 ++	 —

[図11]

	試薬(1b)	試薬(2b)	試薬(3b)		試薬(1b)	試薬(2b)	試薬(3b)
リジン60				SBA			
リジン120				PNA			
アルブミン				MPL			
グロブリン				MAM			
ConA				SSA			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/314378

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/53(2006.01)i, G01N33/553(2006.01)i, G01N33/566(2006.01)i,
G01N33/543(2006.01)n

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)

G01N33/53, G01N33/553, G01N33/566, G01N33/543

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)

CAPLUS (STN), JSTPLUS (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Stine, R. & Pishko, M.V., "Comparison of glycosphingolipids and antibodies as receptor molecules for ricin detection", Anal.Chem., 01 May, 2005 (01.05.05), Vol.77, pages 2882 to 2888	1-21
A	Narang, U. et al., "Fiber optic-based biosensor for ricin", Biosensors & Bioelectronics, 1997, Vol.12, No.9-10, pages 937 to 945	1-21
A	Puu, G., "An approach for analysis of protein toxins based on thin films of lipid mixtures in an optical biosensor", Anal.Chem., 2001, Vol.73, pages 72 to 79	1-21

☒ 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
22 August, 2006 (22.08.06)

Date of mailing of the international search report
29 August, 2006 (29.08.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/314378

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Gustafson, I., "Investigating the interaction of the toxin ricin and its B-chain with immobilized glycolipids in supported phospholipid membranes by surface plasmon resonance", Colloids and surfaces B:Biointerfaces 30, 2003, pages 13 to 24	1-21
A	O'Brien, T. et al., "The development of immunoassays to four biological threat agents in a bidiffractive grating biosensor", Biosensors & Bioelectronics, 2000, Vol.14, pages 815 to 828	1-21
A	Anderson, G.P. et al., "Multi-analyte interrogation using the fiber optic biosensor", Biosensors & Bioelectronics, 2000, Vol.14, pages 771 to 777	1-21
P,X	WO 2005/075493 A1 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 18 August, 2005 (18.08.05), (Family: none)	1-21

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, G01N33/553(2006.01)i, G01N33/566(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)n

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. G01N33/53, G01N33/553, G01N33/566, G01N33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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)

CAplus (STN)、JSTPlus (JDream2)

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
A	Stine, R., & Pishko, M.V., "Comparison of glycosphingolipids and antibodies as receptor molecules for ricin detection", Anal. Chem., 2005.05.01, Vol. 77, p.2882-2888	1 - 2 1
A	Narang, U., et al., "Fiber optic-based biosensor for ricin", Biosensors & Bioelectronics, 1997, Vol.12, No.9-10, p.937-945	1 - 2 1

☒ 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

2 2 . 0 8 . 2 0 0 6

国際調査報告の発送日

2 9 . 0 8 . 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)

白形 由美子

2 J

3 4 9 6

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
A	Puu, G., “An approach for analysis of protein toxins based on thin films of lipid mixtures in an optical biosensor” , Anal. Chem., 2001, Vol. 73, p.72-79	1 - 2 1
A	Gustafson, I., “Investigating the interaction of the toxin ricin and its B-chain with immobilized glycolipids in supported phospholipid membranes by surface plasmon resonance” , Colloids and surfaces B:Biointerfaces 30, 2003, p.13-24	1 - 2 1
A	O’ Brien, T., et al., “The development of immunoassays to four biological threat agents in a bidiffractive grating biosensor” , Biosensors & Bioelectronics, 2000, Vol. 14, p.815-828	1 - 2 1
A	Anderson, G.P. et al., “Multi-analyte interrogation using the fiber optic biosensor” , Biosensors & Bioelectronics, 2000, Vol. 14, p.771-777	1 - 2 1
P X	WO 2005/075493 A1 (独立行政法人産業技術総合研究所) 2005.08.18 (ファミリーなし)	1 - 2 1