明　細　書

発明の名称 ： 糖鎖認識分子を検出するための膜担体

技術分野

[0001] 本発明は、糖鎖を認識する分子を検出するための膜担体、糖鎖を認識する分子をイムノクロマトグラフィーにより検出するためのデバイス、並びに糖鎖を認識する分子をイムノクロマトグラフィーにより検出する方法に関する。

背景技術

[0002] 炎症性疾患や自己免疫疾患において、患者血清中に糖脂質の糖鎖部分を認識する自己抗体が検出される例が知られている。特に、糖脂質は神経組織に多く存在することが知られており、このような自己抗体は、神経を傷害する自己免疫型の神経疾患を起こすことが知られている。

[0003] かかる疾患に対しては、自己抗体を患者の体内から除去する血漿交換療法や免疫吸着療法、自己抗体を中和させる免疫グロブリンの大量静脈注射療法等の治療が行われる。しかしながら、これら治療が有効であるのは、発症してから１週間程度であるため、迅速な診断結果の提供が求められている。

[0004] 自己免疫疾患等の診断法としては、糖脂質そのものを固相化させたマイクロプレートを用いたＥＬＩＳＡ法がある（特許文献１）。しかしながら、この診断法においては、マイクロプレートリーダー等の分析装置を必要とし、また自己抗体等を検出するための工程が煩雑であり、さらには得られた結果の分析には専門的な知識を要するため、患者等から採取した試料を検査センターに送って検査する必要がある。そのため、迅速な診断結果の提供が求められる自己免疫疾患等において、診断に時間を要するＥＬＩＳＡ法は有効性に乏しかった。また、一般的に糖鎖を認識する分子（糖鎖認識分子）は、糖鎖に対する結合性が弱いため、後述の実施例においても示す通り、従前の糖鎖認識分子を検出する系の感度は低いものであった。

[0005] 従って、自己免疫疾患等の診断等において、自己抗体等の糖鎖認識分子を

、場所を選ばず迅速簡便に高感度にて検出できる方法の開発が求められていたが、かかる方法は未だ実用化されていないのが現状である。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開２００３－２９４７５２号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、上記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、糖鎖を認識する分子を、場所を選ばず迅速簡便に高感度にて検出することを可能とする物質及び方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 場所を選ばず迅速簡便に特定の分子を検出できる方法として、イムノクロマトグラフィーが知られている。しかしながら、一般的に糖鎖認識分子と糖鎖との結合性は弱く、またイムノクロマトグラフィーに用いられる膜担体に糖鎖を高密度で固定化することは困難であったため、イムノクロマトグラフィーにおいて、糖鎖認識分子を検出すための十分な感度は得ることが出来なかった。

[0009] しかし、本発明者らが鋭意研究を重ねた結果、糖鎖を結合させたタンパク質を、糖鎖認識分子を検出するためのプローブとして用いれば、イムノクロマトグラフィーに用いられる膜担体に高密度に糖鎖を固定化できることが明らかになった。さらに、かかる糖鎖を結合させたタンパク質が固定化された膜担体を用いたイムノクロマトグラフィーは、従来の糖脂質を固定化したものよりも、糖鎖認識分子を高感度に検出できることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、以下を提供するものである。

＜１＞ 糖鎖を認識する分子をイムノクロマトグラフィーにより検出するためのデバイスに用いられる膜担体であって、当該糖鎖が結合したタンパク質が検出ラインに固定化された膜担体。

＜２＞　前記糖鎖が結合したタンパク質が、還元的アミノ化反応により、前記糖鎖の還元末端と前記タンパク質のアミノ基とが結合してなる、＜１＞に記載の膜担体。

＜３＞　前記タンパク質がアルブミンである、＜１＞又は＜２＞に記載の膜担体。

＜４＞　糖鎖を認識する分子をイムノクロマトグラフィーにより検出する方法であって、

被験試料を、糖鎖を認識する分子を認識しかつ標識されている分子に接触させた後、＜１＞～＜３＞のいずれか一に記載の膜担体において、当該被験試料を前記検出ラインに向けて展開させ、当該検出ラインにおいて前記標識物質を検出する方法。

＜５＞　糖鎖を認識する分子をイムノクロマトグラフィーにより検出するためのデバイスであって、＜１＞～＜３＞のいずれか一に記載の膜担体と、下記（ａ）～（ｃ）からなる群から選択される少なくとも１の構成要素とを備えるデバイス

（ａ）　サンプルパッド

（ｂ）　コンジュゲートパッド

（ｃ）　吸収パッド。

発明の効果

[0010]　本発明によれば、糖鎖を認識する分子を、場所を選ばず迅速簡便に高感度にて検出することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]本発明の糖鎖を認識する分子をイムノクロマトグラフィーにより検出するためのデバイスの好適な一実施形態を示す概略平面図である。

[図2]図１に示すデバイスを図１のＩ－II線に沿って切断した場合の切断面を示す概略側断面図である。

[図3]アルブミンと、アルブミンに糖鎖（ＧＭ１）を結合させたもの（ＧＭ１結合アルブミン）とをＳＤＳ－ＰＡＧＥにて展開したゲルを、タンパク質染

色試薬にて染色した結果を示す写真である。ＧＭ１結合アルブミンの５レーンは左から順に、１０００μｇ、５００μｇ、２５０μｇ、１２５μｇ及び６２．５μｇのＧＭ１と、６６μｇのアルブミンとを反応させたものを展開した結果を各々示す。

[図4]アルブミンとＧＭ１結合アルブミンとをＳＤＳ－ＰＡＧＥにて展開したゲルをＰＶＤＦ膜に転写し、該膜にＨＲＰ標識したコレラトキシンβサブユニット（ＨＲＰ－ＣＴＢ）を作用させ、４－クロロ－１－ナフトールを発色基質として用いて染色した結果を示す写真である。ＧＭ１結合アルブミンの５レーンは左から順に、１０００μｇ、５００μｇ、２５０μｇ、１２５μｇ及び６２．５μｇのＧＭ１と、６６μｇのアルブミンとを反応させたものを展開した結果を各々示す。

[図5]ＧＭ１結合アルブミンとアルブミンとを固定化した膜担体（ＨｉＦｌｏｗ　Ｐｌｕｓ　ＨＦＢ１８０ＵＢＣＡＳＴ、ＨｉＦｌｏｗ　Ｐｌｕｓ　ＨＦＢ０７５０２、ＨｉＦｌｏｗ　Ｐｌｕｓ　ＨＦＢ１２００２）に、ＨＲＰ－ＣＴＢを作用させ、４－クロロ－１－ナフトールを発色基質として用いて染色した結果を示す写真である。

[図6]ＧＭ１結合アルブミンとアルブミンとを固定化した膜担体に、ＨＲＰ－ＣＴＢを作用させ、４－クロロ－１－ナフトールを発色基質として用いて染色した結果を示す写真である。図中の数量（１００ｎｇ、１０ｎｇ、１ｎｇ）は、ＧＭ１結合アルブミン又はアルブミンの膜担体にスポットした量を示す。

[図7]ＧＭ１結合アルブミンとＧＭ１ガングリオシドとを固定化した膜担体に、ＨＲＰ－ＣＴＢを作用させ、４－クロロ－１－ナフトールを発色基質として用いて染色した結果を示す写真である。図中の数量（１００ｎｇ、１０ｎｇ）は、ＧＭ１結合アルブミン又はＧＭ１ガングリオシドの膜担体にスポットした量を示す。

[図8]ＧＭ１結合アルブミンとＧＭ１ガングリオシドとを固定化した膜担体に、ＨＲＰ－ＣＴＢを作用させ、４－クロロ－１－ナフトールを発色基質とし

て用いて染色した結果を示す写真である。図中の濃度（１．０μｇ／ｍＬ、０．１μｇ／ｍＬ、０．０１μｇ／ｍＬ）は、膜担体に作用させたＨＲＰ－ＣＴＢの濃度を示す。

発明を実施するための形態

[0012] （イムノクロマトグラフィーのための膜担体）

本発明は、糖鎖を認識する分子をイムノクロマトグラフィーにより検出するためのデバイスに用いられる膜担体であって、当該糖鎖が結合したタンパク質が検出ラインに固定化された膜担体を提供するものである。

[0013] 本発明において、「糖鎖」とは、単糖類（単糖及びその誘導体）が２つ以上、グリコシド結合により繋がりあった多糖のことであり、本発明にかかるイムノクロマトグラフィーの検出対象である糖鎖認識分子と特異的に結合することができる分子のことである。また、かかる糖鎖は、１種類の単糖類から構成されるもの（ホモ糖鎖）であってもよく、２種類以上の単糖類から構成されるもの（ヘテロ糖鎖）であってもよい。糖鎖を構成する単糖類の種類、個数については特に制限はなく、また単糖類間のグリコシド結合はα結合、β結合のいずれであってもよい。さらに、糖鎖は天然由来のものであってもよく、天然由来のものに人工的に官能基の付加や置換等の修飾を加えたものであってもよく、化学的に合成されたものであってもよい。

[0014] 本発明において、「糖鎖を認識する分子」としては特に制限はなく、前記糖鎖を認識する抗体、前記糖鎖を認識するタンパク質（レクチン）が挙げられる。

[0015] 本発明において、前記糖鎖が結合される「タンパク質」としては、糖鎖を多価に結合し得る限り、該タンパク質を構成するアミノ酸の種類、個数については特に制限はない。また、「タンパク質」は、植物、動物、微生物（菌やウィルス等）等の天然物から、分離・抽出・精製して得られるものであってもよく、また無細胞タンパク質合成系（例えば、網状赤血球抽出液、小麦胚芽抽出液）、大腸菌、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等を用い、遺伝学的手法により合成されたものであってもよく、さらには、自動合成装置等を用

いて化学的に合成されたものであってもよい。本発明にかかる「タンパク質」としては、人為的に糖鎖修飾を施さなければ糖鎖を有していないため、本発明にかかる糖鎖をより多く結合させ易いという観点から、天然物由来のものであればアルブミン、リボヌクレアーゼＡが好ましく、また同観点から、大腸菌を用いて遺伝学的手法により合成されたタンパク質、化学的に合成されたタンパク質が好ましい。

[0016] 本発明において、糖鎖が結合したタンパク質の調製方法としては特に制限はなく、例えば、前記糖鎖の還元末端と前記タンパク質のアミノ基とを結合させる方法（還元的アミノ化反応）、前記糖鎖の還元末端をブロモアセチル化し、前記タンパク質のシステイン中のチオール基と共有結合させる方法、前記糖鎖の還元末端にアミノ基を導入し、前記タンパク質のカルボキシル基と共有結合させる方法、前記糖鎖を化学的に結合させたアミノ酸を重合反応により連結し、前記タンパク質を合成する方法が挙げられるが、糖鎖の還元末端に新たな官能基を導入する必要がなく、反応が簡便であるという観点から、還元的アミノ化反応が好ましい。

[0017] また、前記タンパク質１分子あたりの前記糖鎖の平均結合本数は、前記糖鎖や前記タンパク質の種類、前述の糖鎖が結合したタンパク質の調製方法等によるが、通常１～４０本であり、当該タンパク質における糖鎖の高密度化及び糖鎖が結合しているタンパク質の作製のし易さの観点から、好ましくは５～２５本である。

[0018] 本発明において、前記糖鎖が結合したタンパク質が固定化される「膜担体」としては、糖鎖が結合したタンパク質を固定化することができ、かつイムノクロマトグラフィーに供される被験試料を毛細管現象により展開できる材質からなる膜であればよい。かかる材質としては、例えば、ニトロセルロース等のセルロース類、ポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）、ポリエーテルスルホン（ＰＥＳ）、ポリエチレンテレフタレート（ＰＥＴ）、ポリエチレン、ポリプロピレン、ナイロン類、ガラスファイバーが挙げられる。また、本発明の膜担体の孔径は、特に制限されることなく、被験試料の展開速度等を

考慮して適宜調節すればよく、例えば、０．１～１０μｍである。

[0019] かかる膜担体における「検出ライン」とは、当該膜担体において展開された被験試料中の糖鎖認識分子を捕捉し、検出するための部位である。従って、「検出ライン」は、膜担体において下流側に配置されている必要がある。なお、本発明において、上流側及び下流側とは、被験試料が膜担体を展開していく流れの上流側（後述の図１及び２においては、左側）及び下流側（後述の図１及び２においては、右側）を各々意味する。

[0020] また、「検出ライン」には糖鎖認識分子を捕捉するための分子である、糖鎖が結合したタンパク質が固定化されている必要がある。固定化の方法としては特に制限はなく、例えば、物理吸着、静電的相互作用、疎水的相互作用又は架橋剤を利用する方法が挙げられる。また、糖鎖が結合したタンパク質の固定化量は、膜担体の材質、糖鎖認識分子との結合性、後述の糖鎖を認識する分子を認識する分子の標識の種類等に合わせて適宜調整すればよく、例えば、１ｎｇ～１μｇである。

[0021] （糖鎖を認識する分子をイムノクロマトグラフィーにより検出する方法）

本発明は、糖鎖を認識する分子をイムノクロマトグラフィーにより検出する方法であって、被験試料を、糖鎖を認識する分子を認識しかつ標識されている分子に接触させた後、本発明の膜担体において、当該被験試料を前記検出ラインに向けて展開させ、当該検出ラインにおいて前記標識物質を検出する方法を提供するものである。

[0022] 本発明において「被験試料」としては特に制限はなく、例えば、菌体、土壌、ヒト等の動物から単離される、血液、血清、血漿、髄液、唾液、喀痰、涙液、眼脂、口腔や鼻腔の粘膜、尿、糞便、皮膚、各種臓器、筋肉、骨及び神経、並びにこれらからの抽出液が挙げられる。

[0023] 本発明において、「糖鎖を認識する分子を認識する分子」としては特に制限はなく、糖鎖認識分子を認識する抗体であってもよく、また糖鎖認識分子が抗体である場合には、プロテインＡ、プロテインＧであってもよい。さらには、糖鎖認識分子によって認識される糖鎖であってもよい。また、かかる

「糖鎖を認識する分子を認識する分子」に付加される標識物質としては、例えば、呈色標識物質、酵素標識物質が挙げられる。呈色標識物質としては、金コロイド、白金コロイド等の金属コロイドの他、赤色及び青色等のそれぞれの顔料で着色されたポリスチレンラテックス等の合成ラテックス及び天然ゴムラテックス等のラテックスが挙げられる。酵素標識物質としては、例えば、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、βガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリフォスファターゼが挙げられる。

[0024] 被験試料と糖鎖を認識する分子を認識しかつ標識されている分子との「接触」については、膜担体に導入された被験試料が前記検出ラインに達するまでに行われていればよく、例えば、本発明の膜担体又は後述の本発明のデバイスに被験試料を導入する前に、当該試料に糖鎖を認識する分子を認識しかつ標識されている分子を添加することで接触させてもよく、被験試料を後述のコンジュゲートパッド中を通過させることによって接触させてもよい。

[0025] 本発明において、被験試料と糖鎖を認識する分子を認識しかつ標識されている分子とを毛細管現象により効率良く展開させるために、展開液を用いてもよい。展開液としては、例えば、タンパク質、多糖類、界面活性剤、有機溶媒及びポリマー等の中から少なくとも1種を含む緩衝液が挙げられる。展開液は、被験試料と混合した上で膜担体に導入してもよく、また被験試料等を膜担体に導入した後に、当該膜担体の上流側から導入してもよい。

[0026] そして、被験試料中に糖鎖認識分子が含まれていれば、前記接触により形成される当該糖鎖認識分子と当該分子を認識しかつ標識されている分子との複合体が、前記検出ラインの糖鎖に捕捉されることにより、当該標識物質が当該検出ラインに集積することになる。

[0027] 従って、本発明によれば、検出ラインにおける標識物質を検出することにより、試験試料中の糖鎖認識分子の有無を判断することができる。「標識物質の検出」は、標識物質が前記呈色標識物質であれば、当該検出ラインにおける当該標識物質の集積により生じる着色を目視にて確認することにより行うことができる。また、酵素標識物質であれば、当該酵素の発色基質を検出

ラインに添加することにより生じる発色を目視にて確認することにより行うことができる。かかる発色基質としては、酵素標識物質としてＨＲＰを用いる場合には、例えば、４－クロロー１－ナフトール、ＡＢＴＳ、Ｏ－フェニレンジアミン（ＯＰＤ）、テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）が挙げられる。

[0028] （イムノクロマトグラフィーのためのデバイス）

本発明は、糖鎖を認識する分子をイムノクロマトグラフィーにより検出するためのデバイスであって、前述の本発明の膜担体と、下記（ａ）～（ｃ）からなる群から選択される少なくとも１の構成要素とを備えるデバイス

（ａ） サンプルパッド

（ｂ） コンジュゲートパッド

（ｃ） 吸収パッド

を提供するものである。このような本発明のデバイスの好適な一例を図１及び２に示す。図１は、かかるデバイスの概略平面図であり、図２は、図１に示すデバイスを図１のＩ－II線に沿って切断した場合の切断面を示す概略側断面図である。以下、これら図面を参照しながら本発明のデバイスについて説明する。

[0029] 本発明のデバイスは、図２に示す通り、本発明の膜担体１と、サンプルパッド４、コンジュゲートパッド５及び吸収パッド６からなる群から選択される少なくとも１の構成要素とを備えるデバイスである。

[0030] 膜担体１については前述の通りであるが、図１及び２に示す通り、前述の検出ライン２の他、コントロールライン３を備えていてもよい。

[0031] コントロールライン３は、前述の糖鎖を認識する分子を認識しかつ標識されている分子を捕捉するための部分であるため、前記標識物質が検出ライン２では検出されず、コントロールライン３のみにて検出された場合には、被験試料中に糖鎖認識分子は存在していないと判定することができる。また、コントロールライン３には、前述の糖鎖を認識する分子を認識しかつ標識されている分子を捕捉するために、当該分子と特異的に結合する分子（例えば

、抗体、レクチン、アプタマー）が固定化される。

[0032] サンプルパッド４は、本発明のデバイスに導入された被験試料や展開液等を保持、通過させるための部分である。従って、本発明のデバイスにおいて、サンプルパッド４は、直接又は間接的に膜担体１に接し、かつ膜担体１の上流側に配置されている必要がある。

[0033] コンジュゲートパッド５は、前述の糖鎖を認識する分子を認識しかつ標識されている分子を担持しており、当該分子と被験試料とを接触させるための部分である。従って、本発明のデバイスにおいて、コンジュゲートパッド５は、直接又は間接的にサンプルパッド４及び膜担体１に接し、かつサンプルパッド４の下流側及び膜担体１の上流側に配置されている必要がある。

[0034] 吸収パッド６は、膜担体を通過してきた余剰の被験試料や展開液等を吸収することにより、膜担体における被験試料の展開を促進しつつ、逆流を抑制するための部分である。従って、本発明のデバイスにおいて、吸収パッド６は、直接又は間接的に膜担体１に接し、かつ膜担体１の下流側に配置されている必要がある。

[0035] サンプルパッド４、コンジュゲートパッド５及び吸収パッド６の材質としては、特に限定されず、ニトロセルロース等のセルロース類、ポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）、ポリエーテルスルホン（ＰＥＳ）、ポリエチレンテレフタレート（ＰＥＴ）、ポリエチレン、ポリプロピレン、ナイロン類、ガラスファイバーが挙げられる。

[0036] 本発明のデバイスにおいては、図１及び２に示す通り、前述の膜担体１、サンプルパッド４、コンジュゲートパッド５又は吸収パッド６を保持するために、保持板１２を備えてもよい。保持板１２の材質は、成形の容易さ、コスト、軽量性の点でプラスチックであることが好ましい。プラスチックの材質としては、種々のプラスチック材料を選択することが可能であり、使用する用途、処理、使用する溶媒、生理活性物質、検出方法の特性に合わせて、成形性、耐熱性、耐薬品性、吸着性等を考慮し適宜に選択される。例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリカー

ボネート、ポリエステル、ポリメチルメタクリレート、ポリビニルアセテート、ビニルーアセテート共重合体、スチレンーメチルメタアクリレート共重合体、アクリルニトリルースチレン共重合体、アクリルニトリルーブタジエンースチレン共重合体、ナイロン、ポリメチルペンテン、シリコン樹脂、アミノ樹脂、ポリスルフォン、ポリエーテルスルフォン、ポリエーテルイミド、フッ素樹脂、ポリイミド等が挙げられる。また、これらのプラスチック材料に、顔料、染料、酸化防止剤、難燃剤等の添加物を適宜混合してもよい。

[0037] さらに、本発明のデバイスにおいては、前述の膜担体１、パッド及び保持板１２を固定、保存するためのケージング（上部ケージング１０及び下部ケージング１１）を備えていてもよい。

[0038] 上部ケーシング１０及び下部ケーシング１１の母材には、成形の容易さ、コスト、軽量性の点でプラスチックであることが好ましい。プラスチックの材質としては、例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリメチルメタクリレート、ポリビニルアセテート、ビニルーアセテート共重合体、スチレンーメチルメタアクリレート共重合体、アクリルニトリルースチレン共重合体、アクリルニトリルーブタジエンースチレン共重合体、ナイロン、ポリメチルペンテン、シリコン樹脂、アミノ樹脂、ポリスルフォン、ポリエーテルスルフォン、ポリエーテルイミド、フッ素樹脂、ポリイミド等が挙げられる。また、これらのプラスチック材料に、顔料、染料、酸化防止剤、難燃剤等の添加物を適宜混合してもよい。

[0039] また、上部ケーシング１０、下部ケーシング１１には、サンプルパッド４、コンジュゲートパッド５、膜担体１、吸収パッド６、保持板１２等の内容物を固定するための構造物を適宜形成することができる。

[0040] また、本発明のデバイスにおいては、図１及び２に示す通り、上部ケーシング１０には、導入口７、判定窓８又は空気穴９が形成されていてもよい。

[0041] 導入口７は、イムノクロマトグラフィーに供するための被験試料が導入されるための部分である。その形状について特に制限はないが、図１及び２に

示すような、突起１３を導入口７内部に有していてもよい。この突起により、被験試料を収納している容器（検体採取用容器）の封（シール）を破断することにより、検体が外部に漏れることなく、検出ライン２側に迅速に展開することが可能となる（検体採取用容器、封及び突起については、特開２０１０－３８７９７号公報　参照）。

[0042] 判定窓８は、膜担体１における検出ライン２及び後述のコントロールライン３を視認し、被験試料中の糖鎖認識分子の有無の判定等を行うための部分である。判定窓８は、例えば、上部ケージングがその厚さ方向に貫通されることによって形成されるものであってもよく、さらに、この貫通孔に透明のプラスチック板やフィルムが付加されていてもよい。

[0043] 空気穴９は、前記ケージング内の空気を排出するための部分であり、これにより、後述の吸収パッド６による被験試料の吸収効率を向上させ、ひいては膜担体における被験試料の迅速な展開を可能とする。空気穴９は、上部ケージングがその厚さ方向に貫通されることによって形成されるものであればよく、その形状、個数については特に制限はなく、例えば、図１及び２に示すような、３個の長方形状の貫通孔が挙げられる。

[0044] 本発明のデバイスの大きさについて、特に制限はないが、例えば、図１及び２において示されるデバイス（ケージング）の大きさとしては、長さ５～１１ｃｍ、幅１～３ｃｍ、高さ０．２～１．５ｃｍが挙げられる。

[0045] 以上、本発明のデバイスの好適な実施形態について説明したが、本発明のデバイスは上記実施形態に限定されるものではない。当業者であれば、上記を参酌しながら、デバイスの構成、材質、構造等について、適宜応用、変形、追加等を加えることができる。

実施例

[0046] 以下、実施例及び比較例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0047] ＜糖鎖が結合したタンパク質の調製＞

先ず、糖脂質（ガングリオシドＧＭ１）の糖鎖（ＧＭ１）の還元末端と、

ヒト由来アルブミンのアミノ基とを結合させるべく、還元アミノ化反応を行った。この還元アミノ化反応においては、６６μｇのアルブミンに対し、反応させる糖鎖量は１０００μｇ、５００μｇ、２５０μｇ、１２５μｇ又は６２．５μｇとした。

[0048] 次に、得られた生成物又はアルブミンのみを、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにて展開し、タンパク質染色試薬（ジェルコード（登録商標）ブルー染色試薬、サーモサイエンティフィック社製）にて染色した。得られた結果を図３に示す。

[0049] また、前記生成物又はアルブミンのみを展開したゲルをＰＶＤＦ膜に転写した。次いで、ＧＭ１認識分子として知られているコレラトキシンβサブユニットをＨＲＰにて標識したもの（以下、「ＨＲＰ－ＣＴＢ」とも称する。ＨＲＰ－ＣＴＢの濃度：０．２μｇ／ｍＬ）を、当該ＰＶＤＦ膜に作用させた。そして、ＨＲＰの発色基質である４－クロロ－１－ナフトールにて当該ゲルを染色した。得られた結果を図４に示す。

[0050] 図４に示した結果から明らかなように、アルブミンのみを電気泳動したレーンにおいてＨＲＰ－ＣＴＢによる発色は認められなかった。一方、作製した５種のＧＭ１結合アルブミンを泳動したレーンにおいては、約８６、８４、７９、７６及び７３ｋＤａのバンドが、ＨＲＰ－ＣＴＢによる発色により、特異的に検出された。従って、還元的アミノ化反応により、アルブミンにＧＭ１が結合した糖タンパク質が作製できることが明らかになった。

[0051] また、図３に示す通り、タンパク質を一様に染色するジェルコードブルー染色試薬を用いて染色した結果、アルブミンを電気泳動したレーンにおいて、アルブミンの分子量に一致する約６６ｋＤａのバンドが確認された。さらに、図４に示す通り、作製したＧＭ１結合アルブミンの分子量は、約８６、８４、７９、７６又は７３ｋＤａであることから、アルブミンに結合した糖鎖による分子量の増加分は約２０、１８、１３、１０又は７ｋＤａであることが分かった。また、ＧＭ１糖鎖一本当たりの分子量は約１ｋＤａであるので、アルブミン１分子に結合している糖鎖の平均本数は、約２０、１８、１３、１０又は７本であることが明らかになった。さらに、反応させた糖鎖の

量を考慮するに、アルブミン１分子に結合している糖鎖の平均本数は、還元アミノ化反応における糖鎖の仕込み量に応じて増加させることができることも明らかになった。さらにまた、図４に示す通り、１分子あたり平均２０本のＧＭ１が結合しているアルブミンの方が、平均７本のＧＭ１が結合しているアルブミンよりも多く、当該糖鎖（ＧＭ１）を認識する分子であるＣＴＢと結合していることが明らかになった。

[0052] ＜糖鎖が結合したタンパク質が固定化された膜担体の調製＞

前記の通り調製したＧＭ１結合アルブミン（アルブミン１分子に結合している糖鎖の平均本数：２０）又はアルブミンを１μｇずつ、三種類のイムノクロマトメンブレンにスポットした。用いたメンブレンは、ニトロセルロースからなるミリポア社製のメンブレン ＨｉＦｌｏｗ Ｐｌｕｓ ＨＦＢ１８０ＵＢＣＡＳＴ、ＨｉＦｌｏｗ Ｐｌｕｓ ＨＦＢ０７５０２及びＨｉＦｌｏｗ Ｐｌｕｓ ＨＦＢ１２００２である。そして、ＧＭ１結合アルブミン又はアルブミンをスポットしたメンブレンを風乾させた後、ＨＲＰ－ＣＴＢ（ＨＲＰ－ＣＴＢの濃度：０．２μｇ／ｍＬ）及び４－クロロ－１－ナフトールを用いて、発色させた。得られた結果を図５に示す。

[0053] 図５に示した結果から明らかなように、ＧＭ１結合アルブミンをスポットした箇所において発色が認められた。一方、アルブミンのみをスポットした箇所では発色が認められなかったことから、ＧＭ１結合アルブミンを試した３種いずれのイムノクロマトメンブレンにおいても固定化できることが明らかになった。

[0054] また、メンブレンにスポットする量を１μｇから、１００ｎｇ、１０ｎｇ又は１ｎｇに変えて、前記同様に、ＧＭ１結合アルブミンをイムノクロマトメンブレン（ＨｉＦｌｏｗ Ｐｌｕｓ ＨＦＢ１８０ＵＢＣＡＳＴ）に固定化し、そして、ＨＲＰ－ＣＴＢ（ＨＲＰ－ＣＴＢの濃度：０．２μｇ／ｍＬ）及び４－クロロ－１－ナフトールにより検出した。得られた結果を図６に示す。

[0055] 図６に示す通り、１０ｎｇ以上のＧＭ１結合アルブミンを固定化したイム

ノクロマトメンブレンによって、ＧＭ１に結合する分子であるコレラトキシンβサブユニット（以下「ＣＴＢ」とも称する）を検出できることが明らかになった。

[0056] ＜糖鎖が結合したタンパク質が固定化された膜担体についての検証＞

糖脂質認識分子を検出する方法として、ＥＬＩＳＡ法がある。ＥＬＩＳＡ法において、糖脂質認識分子を検出する場合には、通常１ウェルあたり１００ｎｇのＧＭ１ガングリオシドが固定化されたマイクロプレートが用いられる（特許文献１　参照）。そこで、糖脂質認識分子を検出する点において、かかるＥＬＩＳＡ法と、本発明の膜担体を用いたイムノクロマトグラフィーとを比較した。

[0057] すなわち、先ず、１００ｎｇ及び１０ｎｇのＧＭ１結合アルブミン（アルブミン１分子に結合している糖鎖の平均本数：２０）をメンブレン（ＨｉＦｌｏｗ　Ｐｌｕｓ　ＨＦＢ１８０ＵＢＣＡＳＴ）にスポットし、固定化することによる調製した本発明の膜担体（実施例１及び２）を用意した。また、ＧＭ１結合アルブミンの代わりに、１００ｎｇ及び１０ｎｇのＧＭ１ガングリオシドを固定化した膜担体（比較例１及び２）を用意した。なお、ＧＭ１結合アルブミン１００ｎｇ及び１０ｎｇは、ＧＭ１ガングリオシド５０ｎｇ及び５ｎｇ相当のＧＭ１を含んでいることが推定される。そして、これら膜担体にＨＲＰ－ＣＴＢ（ＨＲＰ－ＣＴＢの濃度：０．２μｇ／ｍＬ）を作用させた後、４－クロロ－１－ナフトールを発色基質として用いて染色した。得られた結果を図７に示す。

[0058] 図７に示した結果から明らかな通り、ＧＭ１ガングリオシド５ｎｇ相当に相当するＧＭ１結合アルブミンが固定化されている本発明の膜担体（実施例２）における染色性は、ＧＭ１ガングリオシド１００ｎｇが固定化されている膜担体（比較例１）におけるそれと同等であった。また、ＧＭ１ガングリオシド５０ｎｇ相当に相当するＧＭ１結合アルブミンが固定化されている本発明の膜担体（実施例１）における染色性は、比較例１におけるそれよりも顕著に優れていた。従って、ＣＴＢに対する結合能は、ＧＭ１ガングリオシ

ドよりもＧＭ１結合アルブミンの方が顕著に強く、また、ＧＭ１ガングリオシドを用いたＥＬＩＳＡ法よりも本発明の膜担体を用いたイムノクロマトグラフィーの方が、糖脂質認識分子（ＣＴＢ）を検出する点において顕著に優れていることが明らかになった。

[0059] 次に、ＧＭ１結合アルブミンが糖脂質認識分子を感度良く検出できるかどうかを検証した。すなわち、実施例１及び２同様に０．７μｇのＧＭ１結合アルブミンを固定化させた本発明の膜担体（実施例３）と、比較例１及び２同様に１μｇのＧＭ１ガングリオシドを固定化させた膜担体（比較例３）とを調製した。そして、これら膜担体にＨＲＰ－ＣＴＢを作用させた後、４－クロロ－１－ナフトールを発色基質として用いて染色した。なお、作用させたＨＲＰ－ＣＴＢ溶液におけるＨＲＰ－ＣＴＢの濃度は、１．０、０．１又は０．０１μｇ／ｍＬである。また、０．７μｇのＧＭ１結合アルブミンは、ＧＭ１ガングリオシド０．３５μｇ相当のＧＭ１を含んでいることが推定される。得られた結果を図８に示す。

[0060] 図８に示した結果から明らかなように、１μｇのＧＭ１ガングリオシドを固定化した膜担体（比較例３）においては、ＨＲＰ－ＣＴＢの濃度が０．１～１．０μｇ／ｍＬ程度でないと検出できないのに対し、ＧＭ１結合アルブミンは、糖鎖量がＧＭ１ガングリオシドの約３５％しかないにも関わらず、ＨＲＰ－ＣＴＢの濃度が０．０１μｇ／ｍＬ程度でも検出できることが明らかになった。

[0061] 従って、糖鎖を結合させたタンパク質を膜担体に固定化させることで、当該膜担体に高密度に糖鎖を固定化できることが明らかになった。そして、かかる膜担体を用いることにより、従来の方法（例えば、ＥＬＩＳＡ法）よりも、糖鎖認識分子を高感度に検出できることが明らかになった。

産業上の利用可能性

[0062] 以上説明したように、本発明によれば、糖鎖を認識する分子を、場所を選ばず迅速簡便に高感度にて検出することが可能となる。

[0063] 従って、本発明の膜担体等を用いたイムノクロマトグラフィーは、糖鎖を

認識する分子（レクチン、糖鎖を認識する抗体）の検出を必要とする研究開発や、糖鎖を認識する自己抗体が関与する疾患の診断において有用である。

符号の説明

[0064] １…膜担体、２…検出ライン、３…コントロールライン、４…サンプルパッド、５…コンジュゲートパッド、６…吸収パッド、７…導入口、８…判定窓、９…空気穴、１０…上部ケージング、１１…下部ケージング、１２…保持板、１３…突起

請求の範囲

［請求項1］ 糖鎖を認識する分子をイムノクロマトグラフィーにより検出するためのデバイスに用いられる膜担体であって、当該糖鎖が結合したタンパク質が検出ラインに固定化された膜担体。

［請求項2］ 前記糖鎖が結合したタンパク質が、還元的アミノ化反応により、前記糖鎖の還元末端と前記タンパク質のアミノ基とが結合してなる、請求項１に記載の膜担体。

［請求項3］ 前記タンパク質がアルブミンである、請求項１又は２に記載の膜担体。

［請求項4］ 糖鎖を認識する分子をイムノクロマトグラフィーにより検出する方法であって、

被験試料を、糖鎖を認識する分子を認識しかつ標識されている分子に接触させた後、請求項１～３のいずれか一項に記載の膜担体において、当該被験試料を前記検出ラインに向けて展開させ、当該検出ラインにおいて前記標識物質を検出する方法。

［請求項5］ 糖鎖を認識する分子をイムノクロマトグラフィーにより検出するためのデバイスであって、請求項１～３のいずれか一項に記載の膜担体と、下記（ａ）～（ｃ）からなる群から選択される少なくとも１の構成要素とを備えるデバイス

（ａ） サンプルパッド

（ｂ） コンジュゲートパッド

（ｃ） 吸収パッド。