

(19) 日本国特許庁 (JP)

再 公 表 特 許 (A1)

(11) 国際公開番号

W02016/017037

発行日 平成29年4月27日 (2017. 4. 27)

(43) 国際公開日 平成28年2月4日 (2016. 2. 4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/544 (2006.01)	GO 1 N 33/544 Z	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 9
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	4 B O 6 5
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 F	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 44 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2015-540381 (P2015-540381)	(71) 出願人	503100821
(21) 国際出願番号	PCT/JP2014/070396		株式会社ピークル
(22) 国際出願日	平成26年8月1日 (2014. 8. 1)		京都府京都市山科区上花山坂尻2 5 - 1 0
(11) 特許番号	特許第5867890号 (P5867890)	(74) 代理人	110000796
(45) 特許公報発行日	平成28年2月24日 (2016. 2. 24)		特許業務法人三枝国際特許事務所
		(72) 発明者	郷 保正
			京都府京都市山科区上花山坂尻2 5 - 1 0
			株式会社ピークル内
		(72) 発明者	織田 康則
			京都府京都市山科区上花山坂尻2 5 - 1 0
			株式会社ピークル内
		F ターム (参考)	4B024 AA14 BA33 CA06 DA12 EA04
			GA11 HA15
			4B029 AA07 BB13 CC01 FA11 GB09
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫学的測定法に用いられるウイルス様粒子、それに用いられるブロッキング剤、及びこれらを含むキット

(57) 【要約】

本発明は、検出感度に優れ、且つ検出バックグラウンドを顕著に抑制する免疫学的測定法を提供することを目的とする。その解決手段は、ウイルス様粒子であって、該ウイルス様粒子が自己組織化能を有するタンパク質を含み、該自己組織化能を有するタンパク質の少なくとも1つのシステイン残基のチオール基を介して生理活性分子によって修飾されてなるウイルス様粒子を提供することである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

自己組織化能を有するタンパク質を含む免疫学的測定用ウイルス様粒子であって、該自己組織化能を有するタンパク質の少なくとも 1 つのシステイン残基のチオール基を介して生理活性分子によって修飾されてなる、ウイルス様粒子。

【請求項 2】

前記自己組織化能を有するタンパク質が H B s A g タンパク質である、請求項 1 に記載のウイルス様粒子。

【請求項 3】

前記自己組織化能を有するタンパク質が配列番号 1 に示すアミノ酸配列を含む請求項 1 のウイルス様粒子。

10

【請求項 4】

前記自己組織化能を有するタンパク質が抗体結合ドメインを有する、請求項 1 ～ 3 の何れか 1 項に記載のウイルス様粒子。

【請求項 5】

前記生理活性分子が、酵素、抗体結合ドメイン、ビオチン、蛍光色素、発光色素、及びアビジン化合物からなる群より選択される少なくとも一種である、請求項 1 ～ 4 の何れか 1 項に記載のウイルス様粒子。

【請求項 6】

前記抗体結合ドメインが、プロテイン A 中の抗体結合ドメイン、プロテイン G 中の抗体結合ドメイン、及びプロテイン L 中の抗体結合ドメインからなる群より選択される少なくとも一種である、請求項 4 又は 5 に記載のウイルス様粒子。

20

【請求項 7】

前記抗体結合ドメインが、配列番号 3 ～ 5 の何れかに示されるアミノ酸配列からなる請求項 4 又は 5 に記載のウイルス粒子。

【請求項 8】

請求項 1 ～ 7 の何れか 1 項に記載のウイルス様粒子であって、生理活性分子が抗体結合ドメインであり、該抗体結合ドメインに抗体が結合してなるウイルス様粒子。

【請求項 9】

請求項 1 ～ 8 の何れか 1 項に記載のウイルス様粒子を用いた免疫学的測定用ブロッキング剤であって、当該ブロッキング剤が、ヒドロキシアルキルセルロース、ポリビニルアルコール、エチレンオキシド／プロピレンオキシド共重合体、及び 2-メタクリロイルオキシエチルホスホコリンで構成される共重合体からなる群より選択される少なくとも 1 種を含むブロッキング剤。

30

【請求項 10】

前記エチレンオキシド／プロピレンオキシド共重合体が、プルロニック（登録商標）である請求項 9 に記載のブロッキング剤。

【請求項 11】

2-メタクリロイルオキシエチルホスホコリンで構成される共重合体が、バイオリピジュア（登録商標）である、請求項 9 に記載のブロッキング剤。

40

【請求項 12】

請求項 1 ～ 8 の何れか 1 項に記載のウイルス様粒子と請求項 9 ～ 12 の何れか 1 項に記載のブロッキング剤を含む免疫学的測定用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は免疫学的測定法に用いられるウイルス様粒子、それに用いられるブロッキング剤、及びこれらを含むキットに関する。

【背景技術】

【0002】

50

各種の粒子をイムノアッセイのセンサーとして利用する方法が知られている（特許文献 1～8）。例えば、特許文献 1 又は特許文献 2 では蛍光性の半導体ナノ粒子またはシリカ粒子をイムノアッセイの検出素子として利用する方法が提示されており、ナノ粒子が発生する蛍光でイムノアッセイを行う手法である。

【0003】

一方、特許文献 8 では金属材料、磁性材料、または半導体材料を核として各種ペプチドを結合させたナノ粒子コンジュゲートが提示されている。

【0004】

B 型肝炎ウイルス表面抗原を有するウイルス様粒子であって、斯かる抗原の N 末端にある P r e - S 1 及び P r e - S 2 領域に、プロテイン A 由来の抗体の F c 領域に対する結合ドメイン（Z タグ）がタンデムで 2 個挿入されたもの（以後 Z Z - B N C と呼ぶことがある。）は、酵母を用いて遺伝子組み換えで製造した L 型の B 型肝炎ウイルス粒子（特許文献 9）の P r e - S 1 及び P r e - S 2 領域にプロテイン A 由来の抗体の F c 領域に対する結合ドメイン（Z タグ）を 2 個挿入したものであり、その製造法や薬物送達システムとしての有用性は特許文献 10 に記載されている。

【0005】

この B N C - Z Z の持つ高いセンサー素子としての機能に注目し、特許文献 3 では酵素標識抗体と B N C - Z Z を併用した利用方法、蛍光標識した B N C - Z Z による抗体検出法、イムノアッセイで利用する方法が実施例として例示されている。特許文献 6 では B N C - Z Z を固相化抗体の整列に利用して感度を高める手法が例示されている。特許文献 4 ではビオチン化した B N C - Z Z の免疫学的測定への利用方法が記載されており、ビオチン化 B N C - Z Z にストレプトアビジンを介してビオチン化 H R P 酵素を又はビオチン化抗体を結合させることで、ビオチン化されていない B N C - Z Z を用いるよりも感度上昇が図れることが実施例に例示されている。

【0006】

特許文献 5 では B N C - Z Z 粒子の持つ抗体結合能を上げることで免疫学的測定の感度を上げるため Z Z タグを持つタンパク質分子と P r e - S 領域を持たないタンパク質分子を有するハイブリッド型の粒子の製法と利用方法が記載されている。さらに、特許文献 7 では蛍光標識した B N C - Z Z へ抗体を弱く架橋することによって多抗原を同時検出する手法が実施例に例示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献 1】特表 2006-517985 号公報

【特許文献 2】特表 2002-544488 号公報

【特許文献 3】特開 2007-127626 号公報

【特許文献 4】特開 2008-191143 号公報

【特許文献 5】特開 2010-096677 号公報

【特許文献 6】特開 2007-121276 号公報

【特許文献 7】特開 2010-210444 号公報

【特許文献 8】特表 2007-506084 号公報

【特許文献 9】特開 2001-316298 号公報

【特許文献 10】特開 2004-002313 号公報

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献 1】V a c c i n e 19, 3154-3163、2001

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

一般に、イムノアッセイにおいて感度を上昇させるためには、（1）検出素子の検出対

10

20

30

40

50

象物質に対し高い親和性を持つ素子を利用する、(2) 検出対象物質と結合した検出素子の発生するシグナル強度を上げるの、何れかの手法が用いられる。ここで、上述のような BNC-ZZ を検出素子として利用する場合、その検出対象への親和性は一定であるため、発生するシグナル強度を上げることが最も有効な手段となる。

【0010】

しかしながら、BNC-ZZ を利用したことが開示された文献では、よく知られたビオチンとストレプトアビジンの特異的結合能を利用し、HRP 結合量を上昇させてシグナルを上昇させる方法が、ビオチン化 BNC-ZZ として用いられている (特許文献 4) に過ぎず、その検討は行われてこなかった。

【0011】

ZZ-BNC はプロテイン A 由来の抗体結合部位を持つため、免疫学的測定法で重要なマウス IgG₁、ラット IgG、ヒツジ IgG₁、ヤギ IgG₁、ヒト IgG₃ などの抗体との結合が弱く、使用法や使用範囲が大きく制限される。さらに ZZ-BNC は各種 IgG と結合するため、複数抗体が存在する環境、例えば、抗体サンドイッチ ELISA や複数抗体が存在する血清等の評価では目的外の抗体との結合が起こるため、抗体特異的な検出が困難である。

【0012】

そして、実用化を考えた場合、BNC-ZZ やその標識体や修飾体はリポタンパク質であるため、ガラスやプラスチックに非特異的な結合を示す。非特異的吸着はイムノアッセイに大きな影響を与えるのみならず、希釈溶液の長時間保存でも大きな問題となる。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討した結果、ウイルス様粒子に含まれる自己組織化能を有するタンパク質の特定の部位を介して生理活性分子を標識すると、斯かるウイルス様粒子を免疫学的測定に好適に用いることができることを見出した。

【0014】

更に、特定のブロッキング剤が上述のウイルス様粒子を免疫学的測定に用いる際に優れたブロッキング効果を発揮することを見出した。

【0015】

本発明は斯かる知見に基づいて完成されたものであり、以下に示す広い態様の発明を含むものである。

【0016】

項 1 自己組織化能を有するタンパク質を含む免疫学的測定用ウイルス様粒子であって、該自己組織化能を有するタンパク質の少なくとも 1 つのシステイン残基のチオール基を介して生理活性分子によって修飾されてなる、ウイルス様粒子。

【0017】

項 2 前記自己組織化能を有するタンパク質が HBsAg タンパク質である、上記項 1 に記載のウイルス様粒子。

【0018】

項 3 前記自己組織化能を有するタンパク質が配列番号 1 に示すアミノ酸配列を含む上記項 1 のウイルス様粒子。

【0019】

項 4 前記自己組織化能を有するタンパク質が抗体結合ドメインを有する、上記項 1 ～ 項 3 の何れか 1 項に記載のウイルス様粒子。

【0020】

項 5 前記生理活性分子が、酵素、抗体結合ドメイン、ビオチン、蛍光色素、発光色素、及びアビジン化合物からなる群より選択される少なくとも 1 種である、上記項 1 ～ 項 4 の何れか 1 項に記載のウイルス様粒子。

【0021】

項 6 前記酵素が、アルカリホスファターゼ及び／又はペルオキシダーゼである、上記

10

20

30

40

50

項 5 に記載のウイルス様粒子。

【0022】

項 7 前記抗体結合ドメインが、プロテイン A に含まれる抗体結合ドメイン、プロテイン G に含まれる抗体結合ドメイン、及びプロテイン L に含まれる抗体結合ドメインからなる群より選択される少なくとも 1 種である、上記項 4 又は項 5 に記載のウイルス様粒子。

【0023】

項 8 前記抗体結合ドメインが、配列番号 3 ～ 5 の何れかに示されるアミノ酸配列からなる上記項 4 又は項 5 に記載のウイルス粒子。

【0024】

項 9 前記アビジン化合物が、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、A V R タンパク質、ブラダビジン (B r a d a v i d i n) 、リザビジン (R h i z a v i d i n) 、及びタマビジン (登録商標) からなる群より選択される少なくとも 1 種である、上記項 5 に記載のウイルス様粒子。

10

【0025】

項 10 上記項 1 ～ 9 の何れか 1 項に記載のウイルス様粒子であって、生理活性分子が抗体結合ドメインであり、該抗体結合ドメインに抗体が結合してなるウイルス様粒子。

【0026】

項 11 上記項 1 ～ 項 10 の何れか 1 項に記載のウイルス様粒子を用いた免疫学的測定用ブロッキング剤であって、当該ブロッキング剤が、ヒドロキシアルキルセルロース、ポリビニルアルコール、エチレンオキサイド／プロピレンオキサイド共重合体、及び 2-メ
タクリロイルオキシエチルホスホコリンで構成される共重合体からなる群より選択される
少なくとも 1 種を含むブロッキング剤。

20

【0027】

項 12 前記ヒドロキシアルキルセルロースがヒドロキシプロピルメチルセルロースである上記項 11 に記載のブロッキング剤。

【0028】

項 13 前記ポリビニルアルコールの重合度が、200 ～ 5000 である、上記項 11 に記載のブロッキング剤。

【0029】

項 14 前記エチレンオキサイド／プロピレンオキサイド共重合体が、プルロニック (登録商標) である上記項 11 に記載のブロッキング剤。

30

【0030】

項 15 前記エチレンオキサイド／プロピレンオキサイド共重合体が、プルロニック (登録商標) F 1 2 7 及び／又はプルロニック (登録商標) P 1 0 5 である上記項 11 に記載のブロッキング剤。

【0031】

項 16 2-メタクリロイルオキシエチルホスホコリンで構成される共重合体が、バイオリピジュア (登録商標) である、上記項 11 に記載のブロッキング剤。

【0032】

項 17 2-メタクリロイルオキシエチルホスホコリンを構成単位とする重合体がバイオリピジュア (登録商標) 206 及び／又はバイオリピジュア (登録商標) 802 である、上記項 11 に記載のブロッキング剤。

40

【0033】

項 18 上記項 1 ～ 項 10 の何れか 1 項に記載のウイルス様粒子と上記項 11 ～ 項 17 の何れか 1 項に記載のブロッキング剤を含む免疫学的測定用キット。

【発明の効果】

【0034】

本発明に係るウイルス様粒子は、優れた検出感度で免疫学的測定を行うことができる。

【0035】

本発明に係るブロッキング剤は、本発明に係るウイルス様粒子を用いて行う免疫学的測

50

定において、得られるデータのバックグラウンドの低下及び／又は検出シグナルを増感させる作用を発揮し、S／N比を顕著に上昇させることが可能となる。

【0036】

本発明に係るキットを用いた免疫学的測定によると、得られるデータのS／N比を顕著に上昇させることが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】実施例5の結果を示す図。

【図2】実施例6の結果を示す図。

【図3】実施例16の結果を示す図。

10

【図4】実施例17の結果を示す図。

【図5】実施例18の結果を示す図。

【図6】実施例20の結果を示す図。

【図7】実施例21の結果を示す図。

【図8】実施例22の結果を示す図。

【図9】実施例23の結果を示す図。

【図10】実施例24の結果を示す図（抗GF P抗体）。

【図11】実施例24の結果を示す図（HMGモノクローナル抗体）。

【図12】実施例25の結果を示す図。

【図13】実施例27の結果を示す図。

20

【図14】実施例28の結果を示す図。

【図15】実施例29の結果を示す図。

【図16】実施例30の結果を示す図。

【図17】実施例31の結果を示す図。

【図18】実施例32の結果を示す図。

【図19】実施例33の結果を示す図。

【図20】実施例34の結果を示す図。

【図21】実施例35の結果を示す図。

【図22】実施例36の結果を示す図。

【発明を実施するための形態】

30

【0038】

＜ウイルス様粒子＞

本発明に係るウイルス様粒子は、免疫学的測定法に用いられ、自己組織化能を有するタンパク質を含む。自己組織化能を有するタンパク質は、そのシステイン残基のチオール基を介して、生理活性分子が修飾されてなる。

【0039】

自己組織化能を有するタンパク質とは、生体内、特に細胞内で小胞体ルーメン、細胞膜、核膜等の脂質二重膜を巻き込んでウイルス様粒子を形成し得るタンパク質であり、且つシステイン残基を有する範囲において特に限定はされないが、例えば、エンベロープを有するウイルスの出芽機能に関連するタンパク質、エンベロープタンパク質、又はこれらの変異体等が挙げられる。

40

【0040】

エンベロープを有するウイルスは、特に限定はされないが、例えば、B型肝炎ウイルス（HBV）、アヒルB型肝炎ウイルス等のヘパドナウイルス科に属するウイルス；セグアイウイルス（HVJ）等のパラミクソウイルス科に属するウイルス；単純ヘルペスウイルス等のヘルペスウイルス科に属するウイルス；インフルエンザウイルス等のオルトミクソウイルス科に属するウイルス；ヒト免疫不全ウイルス等のレトロウイルス科に属するウイルス等が挙げられる。

【0041】

自己組織化能を有するタンパク質は特に限定はされないが、例えば、HVBの出芽機能

50

に関連するタンパク質であるB型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)タンパク質；HVJの出芽機能に関連するタンパク質であるFプロテイン、ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼタンパク質、又はこれらの変異体が挙げられる。中でもHBsAgタンパク質、Fプロテイン、ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼタンパク質、これらの変異体等が好ましい。

【0042】

変異体とは、少なくとも一つ以上のシステイン残基を有し、且つ上述のようなウイルス様粒子を形成し得る作用を発揮する範囲に限りにおいて、特に限定はされることがなく、具体的な変異導入数も同様の範囲において、特に限定はされないが、通常は変異導入前のアミノ酸配列と85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、最も好ましくは99%以上の同一性を有する変異体となるような変異導入数とすればよい。

10

【0043】

なお、ここでいう変異導入とは、置換、欠失、挿入等を包含する。具体的な変異導入については、公知の方法を用いて実施することができ、特に限定はされないが、例えば置換であれば保存的な置換技術を採用すればよい。用語「保存的な置換技術」とは、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基に置換されることを意味する。

【0044】

例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン等といった塩基性側鎖を有するアミノ酸残基同士で置換されることが、保存的な置換技術にあたる。その他、アスパラギン酸、グルタミン酸等といった酸性側鎖を有するアミノ酸残基；グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン等といった非帯電性極性側鎖を有するアミノ酸残基；アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン等といった非極性側鎖を有するアミノ酸残基；スレオニン、バリン、イソロイシン等といったβ-分枝側鎖を有するアミノ酸残基、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン等といった芳香族側鎖を有するアミノ酸残基同士での置換も同様に、保存的な置換にあたる。

20

【0045】

用語「同一性」とは、2以上の対比可能なアミノ酸配列の、お互いに対する同一のアミノ酸配列の程度をいう。従って、ある2つのアミノ酸配列の同一性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。アミノ酸配列又同一性のレベルは、例えば、配列分析用ツールであるFASTAを用い、デフォルトパラメータを用いて決定される。これらの解析方法の具体的な手法は公知であり、National Center of Biotechnology Information (NCBI)のウェブサイト(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を参照すればよい。

30

【0046】

HBsAgとは、特に限定はされないが、例えば配列番号1に示すアミノ酸配列を含むタンパク質等が挙げられ、そのHBsAgの変異体とは、例えば特許文献5や9に記載されるHBsAgの変異体等が挙げられる。Fプロテインとは、特に限定はされないが、例えばNCBIのウェブサイトに登録されたAccession No. NP_056877 ; Version: NP_056877.1 GI : 9627226にて示されるアミノ酸配列からなるタンパク質等が挙げられる。ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼタンパク質とは、特に限定はされないが、例えばNCBIのウェブサイトに登録されたAccession No. NP_056878 ; Version: NP_056878.1 GI : 9627227にて示されるアミノ酸配列からなるタンパク質等が挙げられる。

40

【0047】

自己組織化能を有するタンパク質はシステイン残基を有しており、斯かるシステイン残基のチオール基を介して生理活性分子が修飾されてなる。具体的なシステイン残基は、特に限定はされないが、自己組織化能を有するタンパク質に基づいて形成されたウイルス様粒子の表面に位置する特定のシステイン残基に生理活性分子が修飾されてなることが好ましい。

【0048】

このようなシステイン残基として、例えば上述の配列番号1に示すアミノ酸配列からな

50

るH B s A gタンパク質であれば、107番目、121番目、124番目、137番目、138番目、139番目、147番目、又は149番目のシステイン残基が挙げられる。なお、このH B s A gタンパク質の膜貫通ドメインとして9～28番目、80～98番目、及び170～192番目のアミノ酸配列が推定されている。

【0049】

例えば、上記N C B Iのウェブサイトに記載されたアミノ酸配列からなるFプロテインであれば、70番目、199番目、338番目、347番目、362番目、370番目、394番目、399番目、401番目、又は424番目のシステイン残基が挙げられる。なお、このFプロテインの膜貫通ドメインとして、1～25番目、117～139番目、及び501～523番目のアミノ酸配列が推定されている。

10

【0050】

例えば、上記N C B Iのウェブサイトに記載されたアミノ酸配列からなるヘマグルチニン-ノイラミニダーゼタンパク質であれば、129番目、138番目、161番目、192番目、216番目、258番目、271番目、352番目、357番目、365番目、463番目、469番目、473番目、535番目、544番目、又は571番目のシステイン残基が挙げられる。なお、このヘマグルチニン-ノイラミニダーゼタンパク質の膜貫通ドメインとして、38～60番目のアミノ酸配列が推定されている。

【0051】

生理活性分子とは特に限定はされないが、例えば酵素、抗体結合ドメイン、ビオチン、蛍光色素、発光色素、アビジン化合物等が挙げられる。上述のように、本発明に係る自己組織化能を有するタンパク質のシステイン残基は複数存在し、この中の少なくとも1つのシステイン残基を介して生理活性分子が結合することから、上述の酵素、抗体結合ドメイン、ビオチン、蛍光色素、発光色素、アビジン化合物等のうち、1種のみならず2種以上が組み合わさって別個のシステイン残基を介して結合していてもよい。

20

【0052】

具体的な酵素とは、通常、免疫学的測定分野で酵素であれば、特に限定はされず、例えばペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等が挙げられる。

【0053】

具体的な抗体結合ドメインは、特に限定はされないが、抗体のF cドメインに結合するドメインであることが好ましい。具体的な抗体結合ドメインは、特に限定はされないが、例えばプロテインAに含まれる抗体結合ドメイン（配列番号3）、プロテインGに含まれる抗体結合ドメイン（配列番号4）、及びプロテインLに含まれる抗体結合ドメイン（配列番号5）等が挙げられる。

30

【0054】

生理活性分子に包含される抗体結合ドメインとは、このような抗体結合ドメインが同一又は異なって複数含まれた態様であってもよい。このような態様として、例えば、N末端から順に、プロテインAに含まれる抗体結合ドメイン、プロテインGに含まれる抗体結合ドメイン、及びプロテインGに含まれる抗体結合ドメインの順に配置されたアミノ酸配列からなる抗体結合ドメイン（配列番号6）、N末端から順にプロテインAに含まれる抗体結合ドメインをタンデムで含むZ Zタグ等が挙げられる。

40

【0055】

抗体結合ドメインに結合する抗体は、特に限定はされず、その構造もイムノグロブリンに限定はされず、少なくとも抗原を認識する機能を発揮する構造を有する分子であればよく、例えば多価化抗体などといった積み木構造を有する抗体であってもよい。

【0056】

また、抗体の由来も特に限定されず、抗体産生に適した種々の動物に由来する抗体を用いることができる。

【0057】

例えば、抗体がイムノグロブリンである場合、そのサブタイプは特に限定はされない。また、イムノグロブリンがI g G、I g A等である場合のサブクラスも特に限定はされな

50

い。

【0058】

上述の生理活性分子が抗体結合ドメインである場合、斯かるドメインと上述の抗体が結合した態様も、本発明に係るウイルス様粒子に包含される。なお、抗体結合ドメインと抗体の結合は、更に公知の架橋剤を用いて強固な結合（本明細書中で、不可逆的な結合と呼ぶことがある。）とされていてよい。公知の架橋剤として、 BS_3 等が挙げられる。

【0059】

ビオチン、蛍光色素、及び発光色素は通常、免疫学的測定分野で用いられるものであれば、特に限定はされず公知のものを適宜用いればよい。

【0060】

具体的なアビジン化合物は、特に限定はされないが、例えば、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、AVRタンパク質、ブラダビジン（Bradavidin）、リザビジン（Rhizavidin）、タマビジン等が挙げられる。

【0061】

本発明に係るウイルス様粒子は、公知の方法を用いて自己組織化能を有するタンパク質を含むウイルス様粒子を入手し、これに対してシステイン残基を介して修飾するキット等を用いて上述の生理活性分子を結合させればよい。また、結合させた後に、適宜ゲル濾過等の公知の手段を採用して、精製工程に供してもよい。

【0062】

なお、生理活性分子を結合させた後に、公知の架橋剤を公知の方法で使用して、ウイルス様粒子に含まれる自己組織化能を有するタンパク質のシステイン残基と、生理活性分子との結合を強固にする処理が行われていてもよい。公知の架橋剤として、 BS_3 等が挙げられる。

【0063】

本発明に係るウイルス様粒子には、上述のシステイン残基と結合する生理活性分子の他に、更に生理活性分子（以後明細書中で第2の生理活性分子と呼ぶことがある。）が結合する自己組織化能を有するタンパク質を有する態様ウイルス様粒子も包含される。

【0064】

このような態様のウイルス様粒子として、ウイルス様粒子の脂質二重膜を構成する脂質成分と第2の生理活性分子が結合する態様、上述の自己組織化能を有するタンパク質のシステイン残基以外のアミノ酸残基又は糖鎖を介して第2の生理活性分子が結合する態様、上記自己組織化能を有するタンパク質の特定の部位に第2の生理活性分子が組み込まれた態様が挙げられる。

【0065】

上述の第2の生理活性分子は、上述のシステイン残基を介して修飾される生理活性分子と同様とすることができる。

【0066】

例えば、第2の生理活性分子として抗体結合ドメインが上述の自己組織化能を有するタンパク質のN末端領域に組み込まれた態様として、配列番号2に示すアミノ酸配列からなる自己組織化能を有するタンパク質を有するウイルス様粒子が挙げられる。すなわち、このような自己組織化能を有するタンパク質は、斯かるタンパク質のN末端領域及び斯かるタンパク質の少なくとも1つのシステイン残基のチオール基を介して生理活性分子として抗体結合ドメインを有していてもよい。

【0067】

例えば、上述の自己組織化能を有するタンパク質の糖鎖に第2の生理活性分子が結合する態様であれば、シアル酸等の糖鎖の末端糖残基をアルデヒド化する処理を施して得ることができる。

【0068】

自己組織化能を有するタンパク質と、第2の生理活性分子の結合は、上述のように公知の架橋剤を使用して、結合を強固にする処理が行われていてもよい。公知の架橋剤として

10

20

30

40

50

、 BS_3 等が挙げられる。

【0069】

また、第2の生理活性分子が抗体結合ドメインである場合、斯かるドメインに抗体が結合した態様も、本発明に係るウイルス様粒子に包含される。必要に応じて当該結合を強固にするための架橋処理が施された態様も、本発明に係るウイルス様粒子に包含される。公知の架橋剤として、 BS_3 等が挙げられる。

【0070】

本発明に係るウイルス様粒子の好ましい態様は、自己組織化能を有するタンパク質を含み、(1)当該タンパク質のN末端領域に抗体結合ドメインを有し、且つ当該タンパク質の上述する特定のシステイン残基を介して酵素が結合した態様(下記実施例の「製造例3」における「SH-HRP標識BNC-ZZ」及び「製造例4」における「SH-ALP標識BNC-ZZ」がこれに相当する)；(2)当該タンパク質のN末端領域に抗体結合ドメインを有し、且つ当該タンパク質の上述する特定のシステイン残基を介して抗体結合ドメインが結合した態様(下記実施例の「製造例5」における「AGG-BNC-ZZ」がこれに対応する。)；(3)当該タンパク質のN末端領域に抗体結合ドメインを有し、当該タンパク質の上述する特定のシステイン残基を介して抗体結合ドメインが結合し、且つ当該タンパク質のN末端又はリジン残基を介して酵素が結合する態様(下記実施例の「製造例6」における「HRP標識AGG-BNC-ZZ」がこれに対応する。)；(4)当該タンパク質の上述する特定のシステイン残基を介してアビジン化合物が結合する態様(下記実施例の「製造例8」における「BNC-SA」がこれに対応する。)；(5)当該タンパク質の上述する特定のシステイン残基を介してアビジン化合物が結合し、且つ当該タンパク質のリジン残基を介して酵素が結合する態様(下記実施例の「製造例8」における「HRP標識BNC-SA」がこれに対応する。)；(6)当該タンパク質の上述する特定のシステイン残基を介して酵素が結合する態様(下記実施例の「製造例9」における「HRP標識BNC-L」がこれに対応する。)；(7)当該タンパク質の糖鎖を介して抗体結合ドメインが結合し、且つ当該タンパク質の上述する特定のシステイン残基を介して酵素が結合する態様(下記実施例の「製造例10」における「SH-HRP標識BNC-(糖鎖)-AGG」がこれに対応する。)；(8)当該タンパク質の上述する特定のシステイン残基を介して酵素が結合する態様(下記実施例の「製造例11：HRP標識HVJ-E」がこれに対応する。)等が挙げられる。

【0071】

本明細書において定義する免疫学的測定法とは、抗体による抗原-抗体結合作用を測定原理として採用する測定方法であれば、特に限定はされないが、例えば、ウェスタンブロッティング法、ELISA法、イムノクロマト法、免疫染色法、EIA法、FIA法、及びこれらを基にした各種変法等が挙げられる。

【0072】

<ブロッキング剤>

本発明に係るブロッキング剤は、上述の本発明に係るウイルス様粒子を用いた免疫学的測定法に用いられる。斯かるブロッキング剤は、上述の免疫学的測定において得られるデータのバックグラウンドの低下及び／又は検出シグナルを増感させる作用を発揮し、S/N比を顕著に上昇させることが可能となる。

【0073】

このような効果は得られるデータでのみ評価されるものではなく、例えば免疫学的測定法において汎用される実験器具への上述のウイルス様粒子の吸着抑制を確認することによっても評価される。

【0074】

ウイルス様粒子及び免疫学的測定法は、上記<ウイルス様粒子>にて詳述した通りとすることができる。

【0075】

本発明に係るブロッキング剤は、ヒドロキシアルキルセルロース、ポリビニルアルコール

ル、エチレンオキサイド／プロピレンオキサイド共重合体、２－メタクリロイルオキシエチルホスホコリンで構成される共重合体、又はこれらのうちの２種以上を含むものである。

【００７６】

ヒドロキシアルキルセルローズとは、特に限定はされることはないが、炭素数が１～４程度のアルキル基を有することが好ましい。例えばヒドロキシプロピルセルローズ、ヒドロキシエチルセルローズ、ヒドロキシプロピルメチルセルローズ、ヒドロキシエチルメチルセルローズ、ヒドロキシプロピルエチルセルローズ、ヒドロキシエチルエチルセルローズ等が挙げられ、これら中でもヒドロキシプロピルメチルセルローズが好ましい。

【００７７】

本発明に係るブロッキング剤に含まれるヒドロキシアルキルセルローズは、上述の化合物を２種以上組み合わせたものであってもよく、具体的な入手方法としては、市場からの購入、公知の方法を用いた製造等が挙げられる。

【００７８】

ポリビニルアルコールとは、ビニルアルコールをモノマー単位とするポリマーであればよい。ポリビニルアルコールの重合度は特に限定はされないが、通常２００～５０００程度が好ましく、より好ましくは５００～２０００程度である。

【００７９】

また、通常用いられるポリビニルアルコールはポリ酢酸ビニルを鹼化して得られるものであることが多いため、上述のように酢酸ビニルをモノマー単位として有していてもよい。このような観点に基づき、上述のポリビニルアルコールの鹼化度（モル％）は、通常８０～９８程度とすればよく、好ましくは８５～９８程度である。

【００８０】

本発明に係るブロッキング剤に含まれるポリビニルアルコールは、上述の化合物を２種以上組み合わせたものであってもよく、具体的な入手方法としては、市場からの購入、公知の方法を用いた製造等が挙げられる。

【００８１】

エチレンオキサイド／プロピレンオキサイド共重合体とは、エチレンオキサイドとプロピレンオキサイドをモノマー単位とする共重合体であればよく、特に限定はされないが、例えばプルロニック（登録商標）又はその同等品であることが好ましい。

【００８２】

より好ましいエチレンオキサイド／プロピレンオキサイド共重合体としては、プルロニックＬ３１、プルロニックＬ３５、プルロニックＬ６４、プルロニックＰ９４、プルロニックＦ６８、プルロニックＦ８７、プルロニックＦ－１２７、プルロニックＰ－１０５等（以上、ＢＡＳＦ社商標）が挙げられ、これらの同等品としてポロキサマー（ＩＣＩ社商標）が挙げられる。これら中でも、プルロニックＦ－１２７又はプルロニックＰ－１０５、その同等品等が最も好ましい。

【００８３】

本発明に係るブロッキング剤に含まれるエチレンオキサイド／プロピレンオキサイド共重合体は、上述の化合物を２種以上組み合わせたものであってもよく、具体的な入手方法としては、市場（ＢＳＡＦ社やＩＣＩ社など）からの購入、公知の方法を用いた製造等が挙げられる。

【００８４】

２－メタクリロイルオキシエチルホスホコリンで構成される共重合体とは、２－メタクリロイルオキシエチルホスホコリン及びその他のモノマー成分を構成単位とする共重合体であればよく、特に限定はされない。

【００８５】

より具体的には、上述の２－メタクリロイルオキシエチルホスホコリンで構成される共重合体としては、リピジュア（登録商標）、バイオリピジュア（登録商標）、これらの同等品等が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0086】

好ましい2-メタクリロイルオキシエチルホスホコリンで構成される共重合体としては、例えば、リピジュアBL-405、リピジュアBL-203、リピジュアBL-1002、リピジュアBL-103、リピジュアBL-206、リピジュアBL-802、これらの同等品等が挙げられ、特に限定はされないが、中でも、リピジュアBL-206、リピジュアBL-802、これらの同等品等が最も好ましい（なお、本文中では、例えばリピジュアBL-802はリピジュア802と簡略記載した）。

【0087】

本発明に係るブロッキング剤に含まれる2-メタクリロイルオキシエチルホスホコリンで構成される共重合体は、上述の化合物を2種以上組み合わせたものであってもよく、具体的な入手方法としては、市場（日油株式会社）からの購入、公知の方法を用いた製造等が挙げられる。

10

【0088】

本発明に係るブロッキング剤に含まれるヒドロキシアルキルセルロース、ポリビニルアルコール、エチレンオキサイド／プロピレンオキサイド共重合体、又は2-メタクリロイルオキシエチルホスホコリンで構成される共重合体の含有量は、特に限定はされないが、ブロッキング剤100重量部に対するヒドロキシアルキルセルロース、ポリビニルアルコール、エチレンオキサイド／プロピレンオキサイド共重合体及び2-メタクリロイルオキシエチルホスホコリンで構成される共重合体の総重量が、0.001重量部～100重量部程度とすればよい。すなわち、ヒドロキシアルキルセルロース、ポリビニルアルコール、エチレンオキサイド／プロピレンオキサイド共重合体、又は2-メタクリロイルオキシエチルホスホコリンで構成される共重合体そのものを本発明に係るブロッキング剤としてもよい。

20

【0089】

本発明に係るブロッキング剤には、上述の効果を妨げない範囲に限り、免疫学的測定法にて用いられる、上記ヒドロキシアルキルセルロース、ポリビニルアルコール、エチレンオキサイド／プロピレンオキサイド共重合体、2-メタクリロイルオキシエチルホスホコリンで構成される共重合体以外の成分が含まれていてもよい。具体的な他の成分とは、特に限定はされないが、例えば、防腐剤、pH調整剤、塩、界面活性剤、安定化剤等が挙げられる。また、本発明に係るブロッキング剤は、予め免疫学的測定法にて汎用される、水、緩衝液等に含まれた態様にて提供されてもよく、固体状のものとして提供され、これを上述の水、緩衝液等に溶解させて用時調製して用いることのできる態様で提供されてもよい。

30

【0090】

本発明に係るブロッキング剤の使用量は特に限定はされないが、例えば免疫学的測定において用いる緩衝液等の溶液100容量部に対して、通常は0.0001～5容量部程度とすればよい。

【0091】

<免疫学的測定用キット>

本発明に係る免疫学的測定用キットとは、上述の本発明に係るウイルス様粒子と上述の本発明に係るブロッキング剤とを含む。

40

【0092】

ウイルス様粒子及びブロッキング剤は、上記<ブロッキング剤>にて詳述した通りである。免疫学的測定とは、上記<ウイルス様粒子>にて詳述した免疫学的測定法と同様とすることができる。

【0093】

本発明に係る免疫学的測定用キットには、更に、反応容器、発色・発光基質、反応溶液、標準物質、ディスポーザブル器具、マニュアル等を含んでいてもよい。

【0094】

なお、本発明に係る免疫学的測定用キットにおいて、上述の本発明に係るウイルス様粒

50

子と、上述の本発明に係るブロッキング剤とは、それぞれ別の容器（パック、ボトル等）に充填されていてもよく、同一の容器に充填されていてもよい。また、ウイルス様粒子及びブロッキング剤は、水、緩衝液等に含まれる態様で提供されていてもよく、特にブロッキング剤は粉末状で提供され、免疫学的測定を行う際に水、緩衝液等で適宜用時調製（希釈）して用いられる態様で提供されてもよい。

【実施例】

【0095】

以下に、本発明をより詳細に説明するための実施例を示す。ただし、本願発明が下記に示す実施例に限定されないのは言うまでもない。

【0096】

〔製造例1：BNC-Lの調製〕

BNC-Lとは配列番号1に示すアミノ酸配列からなる自己組織化能を有するHBsAgタンパク質を含むウイルス様粒子であり、特許第4085231号又は特許第4936272号に記載されている方法で調製した。

【0097】

具体的には、特許第4085231号で調製したBNC-Lを発現する酵母を培養し、ガラスビーズを利用して培養菌体を破碎して得られた菌体破碎液を70℃にて20分間の熱処理に供した。熱処理後に遠心工程に供し、得られた上清を回収した後に、硫酸セロフラインカラム及びゲル濾過カラムを用いて精製し、タンパク質濃度が0.2mg/mL以上となるように濃縮して、BNC-Lを得た。

【0098】

なお、配列番号1に示すアミノ酸配列からなる自己組織化能を有するタンパク質を含むBNC-Lは粒子を形成し、粒子当たり当該タンパク質が110分子程度含まれることが報告されている（Yamada et al., Vaccine 19, 3154-3163, 2001）。

【0099】

〔製造例2：BNC-ZZの調製〕

BNC-ZZとは、BNC-L〔製造例1〕に含まれるHBsAgタンパク質のN末端に、プロテインAの2つの抗体結合ドメイン（Zドメイン）をタンデムで有する、配列番号2にて示される自己組織化能を有するタンパク質を含むウイルス様粒子であって、特許第4212921号及び特許第4936272号に記載されている方法で調製した。

【0100】

具体的には、特許第4212921号で調製したBNC-ZZを発現する酵母を培養し、ガラスビーズを利用して培養菌体を破碎して得られた菌体破碎液を70℃にて20分間の熱処理に供した。熱処理後に遠心工程に供し、得られた上清を回収した後に、Porcine IgGカラム及びゲル濾過カラムを用いて精製し、タンパク質濃度が0.2mg/mL以上となるように濃縮して、BNC-ZZを得た。

【0101】

なお、配列番号2に示すアミノ酸配列からなる自己組織化能を有するタンパク質は上記のBNC-Lの類推からBNC-ZZ粒子当たり110分子程度含まれると推定される。また、BNC-ZZは、抗体と混合すると粒子の抗体結合ドメインと抗体のFcドメインとの結合による抗体の抗原結合能を保持した複合体を形成する。BNC-ZZの酵素標識体も同様の複合体を形成する。以下、当該複合体を混合複合体と呼ぶことがある。

【0102】

〔製造例3：HRP標識BNC-ZZの調製〕

BNC-ZZ〔製造例2〕に対して、SH基を介してHRP標識するためのキット及びNH₂基を介してHRP標識するためのキット（それぞれ、Peroxidase Labeling Kit-SH及びPeroxidase Labeling Kit-NH₂；共に同仁化学）を利用し、これらのマニュアルに従ってHRP標識後、ゲル濾過カラムにより精製し、2種類のHRP標識BNC-ZZを得た。

【0103】

10

20

30

40

50

なお、SH基を介したHRP標識ではBNC-ZZ粒子当たり、110分子程度のHRP分子が含まれることを確認した。すなわち、上述の配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質中の少なくとも1つのシステイン残基のSH基に1分子程度のHRP分子が架橋されていることが示唆される。

【0104】

また、HRP標識BNC-ZZの作製時に用いたBNC-ZZはその粒子形状に影響を与えない緩和な条件にてHRP標識処理を施した。実際、粒子径を動的光散乱法にて測定した結果、標識前54nmに対し、標識後は58nmであり、大きな差は認められなかった。したがって、HRP標識されるNH₂基及びSH基は、共に粒子表面に露出したアミノ酸残基に由来するNH₂基及びSH基であることが明らかである。

10

【0105】

BNC-ZZに含まれるタンパク質のアミノ酸配列を示す配列番号2を基にすれば、例えばNH₂基であれば、N末端のNH₂基、若しくは1番目、43番目、67番目、70番目、98番目、112番目、113番目、121番目、125番目、128番目、156番目、170番目、171番目、179番目、308番目、又は327番目の何れかのリジン残基側鎖のNH₂基を介してHRP標識されていることが示唆される。

【0106】

一方で、SH基であれば、例えば、293番目、307番目、310番目、323番目、324番目、325番目、333番目、又は335番目の何れかのシステイン残基のSH基を介してHRP標識されていることが示唆される。

20

【0107】

実施例1

上記製造例3に示す2種類の方法にて調製したHRP標識BNC-ZZのHRP活性を測定する実験を行った。HRPの基質としてSAT-blue溶液（同仁化学）を用い、492nmの吸光度（Abs 492nm）を測定し、また280nmの吸光度を測定して算出したタンパク質量を用いて比活性を求めた。

【0108】

その結果、NH₂基を介してHRP標識したBNC-ZZ（以後これをNH₂-HRP標識BNC-ZZと呼ぶことがある。）の比活性は0.351 unit/μg（U/μg）であり、一方でSH基を介してHRP標識したBNC-ZZ（以後これをSH-HRP標識BNC-ZZと呼ぶことがある。）の比活性は0.844 U/μgであった。すなわち、NH₂-HRP標識BNC-ZZはSH-HRP標識BNC-ZZの約41%の活性しか示さなかった。なお、unitは基質であるSAT-blueを上記の条件で用いて測定した時のAbs 492nm値の特異的な上昇値を示す。

30

【0109】

この結果は、HRPというタンパク質分子が標識できるレベルでアクセス可能なNH₂基はSH基と比べると少ないことを示唆している。また、より多くのHRP分子がSH基を介しては標識可能なことから、この標識法の方が、HRP標識BNC-ZZをより高感度の抗体検出プローブとして利用できる可能性を持つことが明らかとなった。

【0110】

40

〔製造例4：ALP標識BNC-ZZの調製〕

BNC-ZZ〔製造例2〕に対してSH基を介してALP標識するためのキット及びNH₂基を介してALP標識するためのキット（それぞれ、Alkaline Phosphatase Labeling Kit-SH及びAlkaline Phosphatase Labeling Kit-NH₂；共に同仁化学）を利用し、これらのマニュアルに従ってALP標識後、ゲル濾過カラムにより精製し、2種類のALP標識BNC-ZZを得た。

【0111】

また、製造例3にて作製したHRP標識BNC-ZZと同様に、ALP標識BNC-ZZの作製時用いたBNC-ZZは、その粒子形状が破壊されないような条件にてALP標識処理を施した。

50

【0112】

従って、それぞれのALP標識BNC-ZZにおいても、上述のHRP標識BNC-ZZと同様のアミノ酸残基におけるNH₂基又はSH基にALP標識されていることが示唆される。

【0113】

実施例2

上記製造例4に示す2種類の方法にて調製したALP標識BNC-ZZのALP活性を測定する実験を行った。ALPの基質としてpNPP (Sigma Fast p-nitro phenyl phosphate tablets) を用い、405nmの吸光度 (Abs 405nm) を測定し、また、280nmの吸光度を測定して算出したタンパク質量を用いて比活性を求めた。

10

【0114】

その結果、NH₂基を介してALP標識したBNC-ZZ (以後これをNH₂-ALP標識BNC-ZZと呼ぶことがある。) のALP酵素の比活性は3.56 U/μgであり、一方で、SH基を介してALP標識したBNC-ZZ (以後これをSH-ALP標識BNC-ZZと呼ぶことがある。) は5.61 U/μgであった。すなわち、NH₂-ALP標識BNC-ZZはSH-ALP標識BNC-ZZの約60%の活性しか示さなかった。なお、unitは基質であるpNPPを上記の条件で反応させた時のAbs 405nm値の特異的な上昇値を示す。

【0115】

この結果、より多くのALP分子がSH基を介して標識可能なことがわかり、本標識法の方が、ALP標識BNC-ZZをより高感度の抗体検出プローブとして利用できる可能性を持つことが明らかとなった。

20

【0116】

〔製造例5：AGG-BNC-ZZの調製〕

上記Zドメインを有するプロテインA由来の結合ドメイン1個とプロテインG由来の結合ドメイン2個を含む配列番号6に示すアミノ酸配列からなるタンパク質を大腸菌で調製した (以下、これをAGGと呼ぶことがある)。AGGタンパク質溶液にEMCS (同仁化学) を添加して、AGGのアミノ基にマレイミド基を導入した。

【0117】

BNC-ZZ [製造例2] を、TCEP (Thermo Scientific) を用いて還元処理し、還元処理されたBNC-ZZとマレイミド基が導入されたAGGとをインキュベートすることで架橋反応を行い、AGG-BNC-ZZを得た。すなわち、AGG-BNC-ZZとは上記配列番号2にて示されるアミノ酸配列からなるタンパク質を含むウイルス様粒子であって、当該タンパク質中のシステイン残基を介してAGGが結合した粒子である。

30

【0118】

〔製造例6：HRP標識AGG-BNC-ZZの調製〕

Peroxidase labeling Kit-NH₂を用い、そのマニュアルに従ってAGG-BNC-ZZ [製造例5] にHRPを標識し、HRP標識AGG-BNC-ZZを得た。

【0119】

実施例3

HRP標識AGG-BNC-ZZ [製造例6] のHRP酵素活性を、SH-HRP標識BNC-ZZ [製造例3] の酵素活性と比較検討するための実験を行った。両者の一定量を取り、そこへHRPの基質であるTMB溶液 (One-Step TMB Ultra、Thermo Scientific) を添加し、Abs 450nmを測定した。

40

【0120】

その結果、HRP標識AGG-BNC-ZZのHRP比活性はHRP標識BNC-ZZの約1/3であることが分かった。BNC-ZZをNH₂基又はSH経由でHRP標識し、HRP活性を検討した実施例2の結果から判断し、AGG-BNC-ZZもBNC-ZZとほぼ同様の効率でNH₂基を介したHRP標識が可能であることが明らかとなった。

【0121】

50

〔製造例 7：H R P 標識 B N C－Z Z／ウサギ由来抗マウス I g G 抗体複合体の調製〕

製造例 2 に記載したように B N C－Z Z と抗体を混合すると混合複合体が形成される。この混合複合体は抗体の F c 領域と B N C－Z Z の抗体結合部位との結合が可逆的なため複数の抗体存在下では、結合した抗体の入れ替わりがおこる。そこでこの結合を不可逆的な結合にすれば、結合した抗体の持つ結合能を B N C－Z Z に付与できると考えられる。そこで抗体結合ドメインと抗体との結合を架橋したものを以下の様に製造した。即ち、S H－H R P 標識 B N C－Z Z〔製造例 3〕とウサギ由来抗マウス I g G 抗体(Bethyl)を混合して両者の複合体を形成させ、更に架橋剤である B S₃（同仁化学）をそれぞれ終濃度で 0、50、200、400、又は 1000 μ M となる様に加えた。次いで、Protein A Sepharose 樹脂（GE Healthcare）用いて余剰のウサギ由来抗マウス I g G 抗体を除去し、H R P 標識 B N C－Z Z／ウサギ由来抗マウス I g G 抗体複合体を得た。

10

【 0 1 2 2 】

実施例 4

H R P 標識 B N C－Z Z／ウサギ由来抗マウス I g G 抗体複合体〔製造例 7〕の H R P 活性を測定する実験を行った。H R P 標識 B N C－Z Z／抗体複合体を用い、実施例 3 に記載する方法で H R P 活性測定を行った。結果を表 1 に示す。何れの架橋剤濃度を用いた場合でも Abs 450nm はほぼ同じ値を示し、H R P の活性が殆ど変化しないことを示している。

【 0 1 2 3 】

【表 1】

20

<表 1>

各種サンプル	A b s 4 5 0 n m（相対値）
架橋剤 0 μ M（架橋剤なし）	1. 0 0 0
架橋剤 5 0 μ M	0. 9 3 5
架橋剤 2 0 0 μ M	0. 9 6 6
架橋剤 4 0 0 μ M	0. 9 9 8
架橋剤 1 0 0 0 μ M	0. 9 7 8

【 0 1 2 4 】

30

実施例 5

S H－H R P 標識 B N C－Z Z／抗体複合体に結合した抗体の結合様式を評価するために競合実験を行った。正常マウス血清からプロテイン A/G セファロース（GE Healthcare）で精製して得た、抗原特性を持たない I g G（以下、コントロールマウス由来 I g G と呼ぶことがある。）を E L I S A プレートの各ウェルに各種濃度で添加して固相化した。その後、k-Block-e（ピークル社製）を用いてブロッキングした。

【 0 1 2 5 】

H R P 標識 B N C－Z Z／ウサギ由来抗マウス I g G 抗体複合体〔製造例 7〕と、コントロールウサギ由来 I g G（上記と同様に調製、自社製）を混合してインキュベーションした後、その混合物を固相化済みの各ウェルに添加し反応させ、洗浄後、実施例 3 と同様の方法で A b s 4 5 0 n m を測定した。その結果を図 1 に示す。

40

【 0 1 2 6 】

H R P 標識 B N C－Z Z と抗マウス I g G ウサギ由来抗体複合体であって、用いた架橋剤濃度が 0 M のもの、すなわち架橋処理を行わない場合、コントロールウサギ由来 I g G の共存下では、非共存下に比べ、固相化されたマウス由来 I g G に対する反応は全ての濃度範囲で 7 0 % まで低下した。H R P 標識 B N C－Z Z／ウサギ由来抗マウス I g G 抗体複合体に 5 0 μ M の B S₃ を用いて架橋処理を施した場合、コントロールウサギ由来 I g G 存在下では、固相化されたマウス由来 I g G に対して若干の反応の低下がみられ、可逆的な結合が残っていることを示す。そして 2 0 0 μ M の濃度の B S₃ を用いて架橋処理を施した複合体では、コントロールウサギ由来 I g G を添加してもマウス由来 I g G に対す

50

る反応には全く変化がなかった。即ち、 $200\text{ }\mu\text{M}$ の BS_3 で架橋させたHRP標識BNC-ZZ/ウサギ由来抗マウスIgG抗体複合体では、それに結合する抗体の入れ替わりが起こらず、不可逆的な結合による複合体が出来ていることを示す。

【0127】

以上のことから、 $200\text{ }\mu\text{M}$ 以上の濃度の BS_3 で架橋させたHRP標識BNC-ZZ/ウサギ由来抗マウスIgG抗体複合体では不可逆的な結合による複合体ができることが明らかとなった。

【0128】

実施例 6

HRP標識BNC-ZZ/ウサギ由来抗マウスIgG抗体複合体〔製造例7〕の残存抗体結合活性及び可逆的抗体結合活性を評価する実験を行った。上記製造例7に示す各種濃度の架橋剤を用いて処理したHRP標識BNC-ZZ/ウサギ由来抗マウスIgG抗体複合体の製造法において、ウサギ由来抗マウスIgG抗体に換えて、コントロールウサギ由来IgGとの複合体を作製した。なお、使用した BS_3 の濃度は、 $0\text{ }\mu\text{M}$ 、 $50\text{ }\mu\text{M}$ 、及び $200\text{ }\mu\text{M}$ である。これら複合体をELISA用プレートの各ウェルに加えて固相化し、更にk-Block-e（ピークル社製）を用いてブロッキングした。次いで、各ウェルに1/1000、1/5000、及び1/1000に希釈したALP標識ウサギ由来抗マウスIgG抗体（Invitrogen）を添加し反応させ、洗浄後、実施例2と同様の方法でAbs405nmを測定した。結果を図2に示す。

【0129】

BNC-ZZやHRP標識BNC-ZZではALP標識したウサギ抗体は添加量に依存してALP酵素活性が増大し、1/1000希釈を添加時では非添加時に比べ4倍以上になった。このことはALP標識ウサギ抗体がBNC-ZZやHRP標識BNC-ZZの抗体結合部位に結合していることを示している。一方、HRP標識BNC-ZZとコントロールウサギ由来IgGを予め混合しただけで形成させた混合複合体（図中のZZ-HRP 0）や、 BS_3 の $50\text{ }\mu\text{M}$ を加えて架橋させた複合体（図中のZZ-HRP 50）では1/1000希釈添加時で、非添加時に比べ前者で170%、後者で137%のALP活性が見られた。これらの複合体ではALP標識ウサギ抗体が結合可能であることを示しており、その一方で、 BS_3 の $200\text{ }\mu\text{M}$ で架橋させた複合体の場合（図中のZZ-HRP 200）、ALP標識ウサギ抗体の結合は見られなかった。

【0130】

以上のことから、HRP標識BNC-ZZと抗体の複合体の場合、 BS_3 の $200\text{ }\mu\text{M}$ 以上の濃度で架橋させればHRP標識BNC-ZZに残存する抗体結合活性は無く、可逆的な結合もないことを示している。

【0131】

〔製造例8：HRP標識BNC-SA/抗マウスIgG抗体複体の調製〕

EMCSを用いて、ストレプトアビジン（SA；Thermo Scientific社製）のアミノ基にマレイミド基（MAL基）を導入した。次いで、BNC-L〔製造例1〕と上記MAL基が導入されたSAとインキュベートすることで、架橋反応を行い、SA標識BNC-L（以下、BNC-SAと呼ぶことがある。）を得た。すなわち、BNC-SAとは配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質を含むウイルス様粒子であって、当該タンパク質のシステイン残基を介してSAが結合している粒子である。更に、得られたBNC-SAにPeroxidase Labeling Kit- NH_2 を用いてHRPを架橋させ、HRP標識BNC-SAを得た。また、Biotin Labeling Kit- NH_2 （同仁化学）を利用してウサギ由来のビオチン化抗マウスIgG抗体を得た。そして上記HRP標識BNC-SAとウサギ由来ビオチン化抗マウスIgG抗体をタンパク質量として等量混合してHRP標識BNC-SA/ウサギ由来抗マウスIgG抗体複合体を調製した。

【0132】

実施例 7

HRP標識BNC-SA/抗マウスIgG抗体複体のHRP活性を測定する実験を行

った。上記実施例 1 と同様の方法にて H R P 標識 B N C - S A / ウサギ由来抗マウス I g G 抗体複合体〔製造例 8〕の H R P 活性を測定した。

【0133】

その結果、H R P 標識 B N C - S A / ウサギ由来抗マウス I g G 抗体複合体の H R P 活性は、対照の S H - H R P 標識 B N C - Z Z の約 1 / 8 であることが分かった。実施例 1 の結果から、N H ₂ - H R P 標識 B N C - Z Z の H R P 活性は、S H の約 1 / 2 . 4 であることから、H R P 標識 B N C - S A / ウサギ由来抗マウス I g G 抗体の H R P 活性は、N H ₂ - H R P 標識 B N C - Z Z と比べると約 1 / 3 であると判断することができる。

【0134】

実施例 8

B N C - Z Z の容器への吸着とブロッキング剤の効果を検討するための実験を行った。B N C - Z Z〔製造例 2〕を P B S に 3 0 0 n g / m L になる様に溶解した溶液をポリエチレン製マイクロチューブ中に分注し、そこに表 2 に示す各種ブロッキング剤を添加した。各チューブを密栓後、室温で 4 日間、容器を回転させながら放置した後、溶液中に残存する B N C - Z Z 量を測定した。測定には B N C - Z Z の粒子表面の P r e - S l 領域を測定する E L I S A キット (H B Pre-Sl Antigen Quantitative ELISA Kit, Rapid、ビークル社製) を利用し、付属のマニュアルに従って測定した。結果を表 2 に示す。

【0135】

P B S のみの場合、溶液中には 1 . 3 % の B N C - Z Z が残存し、殆どが容器に吸着されることが分かった。これに各種ブロッキング剤を添加すると何れも抑制効果を示したが、効果の高かったのはスキムミルク、ブロックエース (大日本製薬)、Pluronic F-127、Lipidure802 であった。

【0136】

【表 2】

<表 2>

各種ブロッキング剤	溶液中残存率 (%)
PBS (ブロッキング剤なし)	1 . 3
0 . 5 % スキムミルク	9 2 . 3
0 . 4 % B l o c k a c e	9 2 . 5
0 . 1 % P l u r o n i c F - 1 2 7	8 9 . 3
0 . 1 % P l u r o n i c P - 1 0 5	7 7 . 0
0 . 1 % H P M C	5 2 . 8
0 . 1 % P V A - 2 0 0 0	5 7 . 2
0 . 1 % L i p i d u r e 2 0 6	6 1 . 6
0 . 1 % L i p i d u r e 8 0 2	8 1 . 9

【0137】

実施例 9

H R P 標識 B N C - Z Z の容器への吸着とブロッキング剤の効果を検討する実験を行った。表 3 に示す各種ブロッキング剤を含む終濃度 3 0 0 n g / m L の S H - H R P 標識 B N C - Z Z〔製造例 3〕の P B S 溶液を調製し、それぞれ表面処理なしのポリエチレン製チューブ、M P C (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) 処理したチューブ、及びガラスチューブに入れた。すべてのチューブを密栓し、回転させながら 4 °C で 2 日間放置し、溶液中に含まれる H R P 活性を次の方法で測定した。即ち、2 μ g / m L のブタ I g G を E L I S A 用 9 6 穴マイクロプレートの各ウェルへ添加して固相化した。次いで 1 % ブロックエースを添加しブロッキングした。ここへ上述の各種チューブ中で放置した H R P 標識 B N C - Z Z 溶液を各ウェルに添加し、固相化したブタ I g G へ結合させた。次いで、各ウェルに T M B 溶液 (1-Step TMB slow:Thermo Scientific) 添加した後、A b s 4 5 0 n m 値をプレートリーダーにて測定した。各サンプルの H R P 標識 B N C - Z Z

の残存率は、コントロールとして $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ で MPC 処理チューブに同様に保存していたものを $300 \text{ ng}/\text{mL}$ に希釈して得られたものの Abs 450 nm 値を基に算出した。表 3 にその結果を示す。

【0138】

【表 3】

<表 3>

Treatment tube	PBS	0.1% gelatin	0.1% BSA	0.1% HPMC	0.1% Pluronic F127	0.1% Pluronic P105
non-treated PE tube	22.3	66.3	88.5	84.2	92.3	93.3
MPC-treated PE tube	89.1	95.5	99	95.5	99.5	97.8
glass tube	52.4	77.6	94.3	87.6	97.5	90.3

10

【0139】

ブロッキング剤を含まない溶液（表中の PBS）を無処理のプラスチックチューブへ入れたものでは 2 日で 78%、ガラスチューブへは 48% の吸着が起こった。MPC 処理チューブでは吸着は抑え得られたが 10% の吸着が残った。ここへ各種ブロッキング成分を添加すると何れも抑制効果が見られたが、良好な結果を示したものは BSA、HPMC、Pluronic F-127、Pluronic P-105 であった。

【0140】

実施例 10

20

PVDF 膜に対する BNC-ZZ の吸着とブロッキング剤の効果を検討するための実験を行った。PVDF 膜を小片に切り分け、表 4 に示す各種濃度のブロッキング剤を含有する PBS 中に室温で 1 時間浸すことでブロッキング処理を行い、PBS-T にて 3 回洗浄することで膜に結合していないブロッキング剤を除去した。次いで、表 4 に示す各種濃度のブロッキング剤を含有する PBS-T に、BNC-ZZ〔製造例 2〕を $300 \text{ ng}/\text{mL}$ の濃度で溶解した反応溶液を上記ブロッキング済の PVDF 膜と室温で 1 時間反応させ、その後、PBS-T に溶解した HRP 標識ウサギ抗体と室温で 20 分間反応させた。

【0141】

反応終了後、PBS-T にて 5 回洗浄し、HRP の発光用基質である ECL Prime (GE Healthcare) と反応させ、発光検出装置 (ChemiDoc XRS, Bio-Rad) を利用して発光を 20

30

分間露光することで測定した。

【0142】

なお、コントロールとしてブロッキング成分を含まない PBS-T で同じ処理を行ったものを利用した。結果を表 4 に示す。

【0143】

【表 4】

<表 4>

使用したブロッキング剤		結果 シグナル強度
P V D F 膜	反応溶液	
P B S	P B S - T	+++++
5% スキムミルク	1% スキムミルク	—
4% ブロックエース	1% ブロックエース	—
5% BSA	1% BSA	—
1% Pluronic F-127	0.1%Pluronic F-127	—
1% Pluronic P-105	0.1%Pluronic P-105	—
1% HPMC	0.1% HPMC	—
1% PVA2000	0.1% PVA 2000	—
1% PVA500	0.1% PVA 500	—
1% Lipidure 206	0.1% Lipidure 206	—
1% Lipidure 802	0.1% Lipidure 802	—

※シグナル強度は、発光検出装置にて得られた像の強度から、一、十、++、+++、++++、+++++の6段階で評価した。”—”はシグナルが得られなかったことを示す。

【 0 1 4 4 】

ブロッキング剤を含有しない P B S のみで処理した P V D F 膜は、全体が黒くなり P V D F 膜に B N C - Z Z が大量に吸着したことが明らかであった。

【 0 1 4 5 】

一方、各種ブロッキング剤を用いて P V D F 膜にブロッキング処理を施し、更に反応させる B N C - Z Z 溶液中に同じブロッキング剤を含有させた場合には、何れのブロッキング剤でも P V D F 膜への B N C - Z Z の吸着は殆ど認められなかった。

【 0 1 4 6 】

以上のことから、本実験で利用した全てのブロッキング剤は、P V D F 膜のブロッキング処理と反応液中に添加して行うブロッキング処理の両方に用いた場合、ブロッキング効果を発揮することが明らかとなった。

【 0 1 4 7 】

実施例 1 1

P V D F 膜への H R P 標識 B N C - Z Z の吸着とブロッキング剤の効果を検討するための実験を行った。T B S に、5 % のスキムミルク、1 0 % のスキムミルク + 3 % の魚ゼラチン（フナコシ）、4 % のブロックエース、5 % の牛血清アルブミンとなる様に溶解した溶液（メンブレンプロッキング液）を調製した。小片に切り分けた P V D F 膜を、上記メンブレンプロッキング液を用いてブロッキング処理に供した。メンブレンプロッキング処理のコントロールは未処理の P V D F 膜とした。

【 0 1 4 8 】

次いで、S H - H R P 標識 B N C - Z Z [製造例 3] を含む T B S - T を調製し、さらに 1 % のスキムミルク、1 % のブロックエース、1 % の B S A、又は 2 % のゼラチンを添加して、反応ブロッキング液を調製し、上記 P V D F 膜に反応ブロッキング液を添加した。コントロールとして S H - H R P 標識 B N C - Z Z を含む T B S - T を用いた。添加後、適宜洗浄した P V D F 膜を、実施例 1 0 と同様の方法にて検出した。結果を表 5 に示す。

【 0 1 4 9 】

【表 5】

<表5>

		反応ブロッキング液				
		コントロール	1% スキムミルク	1% ブロックエース	1% BSA	1% ゼラチン
メンブレン ブロッキング液	コントロール	+++++	+	+	+++	+
	5%スキムミルク	+++	+	+	+++	+
	4%ブロックエース	+++	+	+	+++	+
	5%BSA	+++	+	+	+++ +	+
	10%スキムミルク +3%ゼラチン	+++	+	+	+++	++

10

※シグナル強度は、発光検出装置にて得られた像の強度から、一、+、++、+++、++++、+++++の6段階で評価した。”一”はシグナルが得られなかったことを示す。

【0150】

PVDF膜をブロッキング処理せず、HRP標識BNC-ZZを含むTBS-Tを添加した場合には、像全体が黒くなり、そのシグナル強度のスコアは+++++であった。これは、HRP標識BNC-ZZが大量にPVDF膜に吸着したことを示す。一方で、各種メンブレンブロッキング液で処理したPVDF膜にHRP標識BNC-ZZを含むTBS-Tを添加した場合、HRP標識BNC-ZZのPVDF膜への吸着は抑制されたが、依然として明らかな吸着反応が見られた。また、PVDF膜をメンブレンブロッキング液で処理し、更に各ブロッキング液を添加した場合には、BSAを含む反応ブロッキング液を除き、コントロールと比べ、HRP標識BNC-ZZのPVDF膜への吸着が強く抑制された。BSAを含む反応ブロッキング液では、他の反応ブロッキング液とは異なり、PVDF膜のブロッキング処理の種類にかかわらず、PVDF膜から得られるシグナル強度の程度が高かった。

20

【0151】

以上の結果は、PVDF膜へのブロッキング処理が、PVDF膜へのHRP標識BNC-ZZの吸着抑制に重要であり、さらに反応ブロッキング液の種類がそれ以上に重要であることを示す。PVDF膜へのブロッキング液は何れも同程度の効果であったが、反応ブロッキング液としては、ブロックエース、スキムミルク、魚ゼラチンはほぼ同程度の効果であるが、BSAは弱いことがわかった。

30

【0152】

実施例12

PVDF膜へのHRP標識BNC-ZZ吸着と化学性ブロッキング剤の効果検討するための実験を行った。TBSにそれぞれ1%の濃度となるように表6に示す各種ブロッキング剤を溶解させた。対照としてTBSに5%スキムミルクが溶解したTBSを調製した。これらを用いてPVDF膜をブロッキングし、次いで、SH-HRP標識BNC-ZZ〔製造例3〕と反応させた後、実施例11と同様の方法にて評価した。結果を表6に示す。

40

【0153】

5%スキムミルクでブロッキング処理したPVDF膜では、膜全体に薄い黒化が見られHRP標識BNC-ZZの膜への吸着が完全には抑制されていなかった。検討した化合物の内、Pluronic F-127、Pluronic P-105、HPMC、PVA2000、PVA500、Lipidure206、及びLipidure802では膜の黒化は殆ど起こらず、強い抑制効果が認められた。

【0154】

【表 6】

各種ブロッキング剤	シグナル強度
5%スキムミルク	++
1%Pluronic F-127	—
1%Pluronic P-105	—
1%CMC	++
1%HPMC	—
1%PVP K-25	+++
1%PVP K-70	++
1%PVA2000	—
1%PVA500	—
1%Lipidure103	++
1%Lipidure206	—
1%Lipidure802	—

※シグナル強度は、発光検出装置にて得られた像の強度から、
一、+、++、+++、++++、+++++の6段階で評価した。
” — ” はシグナルが得られなかったことを示す。

【0155】

実施例 13

ウエスタンブロットにおけるHRP標識BNC-ZZの効果をするための実験を行った。実施例11及び12の結果から、SH-HRP標識BNC-ZZをPVDF膜で利用する際には、ブロッキング剤としてPluronic F-127、Pluronic P-105、HPMC、PVA2000、PVA500、Lipidure206及びLipidure802を利用するとHRP標識BNC-ZZの膜への吸着を抑制し、さらに実施例10の結果からHRP標識BNC-ZZの反応液中にブロッキング剤を含有させるとさらに効果が高いことが想定された。

【0156】

そこでこれらのブロッキング剤を反応液中に含有させた時の効果を、抗vimentin抗体及びSH-HRP標識BNC-ZZ〔製造例3〕を用いたHuH7細胞抽出液のウエスタンブロットにより検討した。検出方法は、実施例10と同様に行った。なお、メンブレンのブロッキングは5%スキムミルクで行い、下記表7に示す各種ブロッキング剤を1%の終濃度となるようにしたものを反応時のブロッキングに用いた。

【0157】

【表 7】

反応ブロッキング剤	バンド	バックグラウンド
Skim milk	++	++
Pluronic F-127	++	—
Pluronic P-105	++	+
HPMC	++	+
PVA 2000	++	—
PVA 500	++	—
Lipidure 206	++	+
Lipidure 802	++	—

※シグナル強度は、発光検出装置にて得られた像の強度から、
一、+、++、+++、++++、+++++の6段階で評価した。
” — ” はシグナルが得られなかったことを示す。

【0158】

1 % のスキムミルクを追加した対照実験ではバックグラウンドとして膜全体に薄い黒化が起こった。一方で、反応液にPluronic F-127、Pluronic P-105、HPMC、PVA2000、PVA500、Lipidure 206及びLipidure 802を添加した場合には、ブロッキング剤の種類により多少効果の差はあるが、何れもバックグラウンドは対照より低く吸着抑制に有効であることがわかった。一方、抗体特異的なバンドのシグナル強度は何れのブロッキング剤でも殆ど変化はなかった。

【0159】

以上の結果から、ブロッキング剤をHRP標識BNC-ZZの反応液中加入することで、HRP標識BNC-ZZの非特異的吸着を抑制可能であり、その時、抗体特異的なシグナルは保持されることが分かった。

【0160】

実施例14

ELISAにおけるプローブの特異的結合に対する各種ブロッキング剤の効果を検討する実験を行った。コントロールマウス由来IgG（ポリクローナル）をELISA用プレートに固相化した。対照としてコントロールマウス由来IgGを固相化しないELISAプレートを用意し、共にk-Block-eによってブロッキング処理を行ったプレートを準備した。

【0161】

これらのプレートに各種プローブ（BNC-ZZ〔製造例2〕、SH-HRP標識BNC-ZZ〔製造例3〕、HRP標識AGG-BNC-ZZ〔製造例6〕、HRP標識BNC-ZZ/ウサギ由来抗マウスIgG抗体複合体〔製造例7〕、及びHRP標識BNC-SA/ウサギ由来抗マウスIgG抗体複合体〔製造例8〕）を一定濃度で添加し、固相化したコントロールマウス由来IgGとの結合反応を観察した。

【0162】

なお、各種プローブと共に、表8に示す各種ブロッキング剤をそれぞれ終濃度で0.1%となるようにして用いた。ブロッキング剤の対照として、終濃度が0.2%となるようにカゼインを含有させたPBS-Tを用いた。

【0163】

なお、BNC-ZZに対してはHRP標識したウサギ由来のコントロールIgG抗体を同時に添加し反応後洗浄し、実施例9と同様の方法にてAbs450nmを測定した。測定値はプローブ毎に、固相化抗体ありでブロッキング成分を含有しない反応液での反応を100%とし、それぞれの固相化抗体なしの値をブランク値として引いたものを特異的反応として示した。結果を表8に示す。

【0164】

【表8】

	none	Pluronic F127	Pluronic P105	HPMC	PVA 500	Lipidure 206	Lipidure 802	Casein
BNC-ZZ + IgG-HRP	-3.6	23.8	29.1	6.2	0.9	32.5	22.3	14.9
HRP-labeled BNC-ZZ	-1.5	17.2	46.4	23.3	-12.1	67.3	45.5	51.5
HRP-labeled AGG-BNC-ZZ	0.8	36.0	60.1	3.0	-1.4	66.1	61.6	17.3
HRP-labeled BNC-ZZ IgG conjugate BS3 50 μ M	-4.5	40.8	66.1	6.9	0.7	64.8	50.4	26.9
HRP-labeled BNC-ZZ IgG conjugate BS3 200 μ M	0.0	27.3	48.7	8.9	0.0	52.9	31.1	13.5
HRP-labeled BNC-ZZ IgG conjugate BS3 400 μ M	-10.4	16.8	41.3	4.5	0.4	46.9	24.2	9.3
HRP-labeled BNC-SA-IgG conjugate	2.2	4.9	10.9	0.6	-1.6	13.6	6.2	3.0

【0165】

ブロッキング成分を全く添加しないで抗体とプローブとの反応を行った場合、非特異的結合は非常に高く特異的な反応はほとんど見られなかった。対照として用いたカゼインの場合、SH-HRP-BNC-ZZではかなりの特異的反応が見られたが、その他のプローブに対する反応は低かった。ブロッキング剤の中ではHPMCとPVAでは特異的反応は低かったが、他のものではプローブによって大きさは異なったものの、良好な特異的反応を示すものが見られた。

【0166】

実施例 15

次いで、実施例 14 にて用いたブロッキング剤の濃度を変えて、各種プローブの ELISA プレートへの吸着と各種ブロッキング剤の特異的反応に対する効果を検討する実験を行った。大腸菌を用いて調製した GF P タンパク質を ELISA 用プレートに固相化し、k-Block-e を用いてブロッキングした。

【0167】

このプレートに、各種ブロッキング剤を添加した各種プローブ（SH-HRP 標識 BNC-ZZ〔製造例 3〕とウサギ由来抗 GF P 抗体の混合複合体；HRP 標識 AGG-BNC-ZZ〔製造例 6〕とウサギ由来抗 GF P 抗体の混合複合体；HRP 標識 BNC-ZZ/ウサギ由来抗 GF P 抗体複合体）を添加し抗原との結合反応を観察した。そして表 9 に示す各種ブロッキング剤を終濃度がそれぞれ 0.01%、0.05%、0.1% となるように 3 つの条件で検討した。

【0168】

なお、HRP 標識 BNC-ZZ/ウサギ由来抗 GF P 抗体複合体は、製造例 7 における BS₃ の濃度を 1000 μM とし、ウサギ由来抗マウス IgG 抗体に換えて、ウサギ由来抗 GF P 抗体を用いて調製した。対照は抗 GF P ウサギ抗体の代わりに上述のコントロールウサギ由来 IgG を利用し、実施例 9 に示す方法と同様の方法で Abs 450 nm を測定した。

【0169】

得られた結果は抗 GF P 抗体が非存在下で得られた値をノイズ値とし、抗 GF P 抗体が存在下で得られた値を特異的シグナル値として、各シグナル値を各ノイズ値で割った数値を S/N 比として表 9 に表した。

【0170】

【表 9】

		Signal/noise ratio		
		HRP-labeled BNC-ZZ	HRP-labeled AGG-BNC-ZZ	HRP-labeled BNC-ZZ/IgG 1000
Pluronic F127	0.10%	6.5	4.2	5.4
	0.05%	10.6	5.8	8.2
	0.01%	9.6	7.2	8.9
Pluronic P105	0.10%	8.2	9.6	5.6
	0.05%	8.4	7.2	6.4
	0.01%	8.5	12.4	10.8
HPMC	0.10%	6.5	6.1	8.3
	0.05%	6.4	6.3	12.7
	0.01%	8.5	8.1	14.3
PVA-500	0.10%	5.9	6.3	10.4
	0.05%	5.6	7.1	9.3
	0.01%	9.9	10.1	13.3
Lipidure 206	0.10%	12.3	6.9	6.5
	0.05%	13.1	8.6	12.0
	0.01%	9.6	9.2	11.7
Lipidure 802	0.10%	12.2	7.7	13.5
	0.05%	9.3	6.9	13.5
	0.01%	9.7	7.0	9.3

【0171】

種々のブロッキング剤はプローブ毎に異なった S/N 比を示し、ブロッキング剤の濃度が高いと高い S/N 比を示すもの、それとは逆にブロッキング剤の濃度が低いと高い S/N

N比を示すものもあった。これらのブロッキング剤は何れも適切な使用濃度で利用すれば、BNC-ZZ等のプローブをELISAで利用する際に有効であることが示唆された。

【0172】

実施例 16

HRP標識BNC-ZZの抗体結合活性を評価する実験を行った。製造例3にて調製したNH₂-HRP標識BNC-ZZとSH-HRP標識BNC-ZZの抗体結合活性をELISAにて比較した。コントロールウサギ由来IgGをELISAプレートに固相化し、各ウェルを1%のブロックエースを用いてブロッキングした。BNC-ZZタンパク質量として0、9.375、18.75、37.5、75、150、300、600 ng/mLの各種濃度のHRP標識BNC-ZZ溶液を調製し、更に終濃度が0.05%となるようにPluronic F-127を含むように添加したPBS-Tをウェルに添加し反応させ、洗浄後、

実施例9に示す方法にてAbs 450 nmを測定した。その結果を図3に示す。

【0173】

全ての濃度で、SH-HRP標識BNC-ZZで得られた測定値の方がNH₂-HRP標識BNC-ZZのそれより高かった。特に、300 ng/mLや600 ng/mLの濃度ではSH-HRP標識BNC-ZZで得られた測定値の方がNH₂-HRP標識BNC-ZZのそれより約2.1倍から2.7倍高かった。この倍率は、上記実施例1に示す両者のHRP比活性の違い（前者が0.844で後者が0.351 U/μgであるので、約2.4倍高い）とほぼ同じレベルであり、何れのHRP標識BNC-ZZもこれらの濃度では固相化抗体にほぼ最大量結合していることが示唆された。一方、これより低い濃度では、SH-HRP標識BNC-ZZとNH₂-HRP標識BNC-ZZで得られた測定値の倍率は高くなり、HRP標識BNC-ZZ濃度が37.5 ng以下では平均で約7.2倍まで高くなった。このことは、低濃度域ではSH-HRP標識BNC-ZZの方がより多く固相化抗体に結合したことを示しており、HRPの比活性が約2.4倍違うことを勘案すると、SH-HRP標識BNC-ZZはNH₂-HRP標識BNC-ZZより、抗体に対する結合親和性が3倍程度も強いことが示唆される。NH₂基を介する標識は粒子を構成するBNC-ZZタンパク質の主にリジン残基をターゲットにして行われるが、リジン残基は抗体結合部位に多く存在することから、NH₂基を介した標識は抗体結合部位に影響を与え抗体の結合を阻害するものと考えられる。一方で、SH基はBNC-ZZタンパク質の膜貫通領域中の外部露出部位に存在することからSH基をターゲットにした場合、抗体結合能に影響を与えないと考えることができる。

【0174】

従って、BNC-ZZをHRP標識する場合、SH基を介して標識した方がBNC-ZZの抗体結合能をより活かすことができること、更にHRP活性も高く、抗体に対する結合活性とHRP標識を併せて約7.2倍高い標識物を形成できることから、SH基を介した標識のほうが遥かに優れていると結論される。以下、特に断らない限り、HRP標識BNC-ZZとはSH基を介したものである。

【0175】

実施例 17

HRP標識BNC-ZZのELISAにおける応用について検討する実験を行った。B型肝炎ウイルスの表面抗原のペプチドであるPre-S2（ビークル社製、製品番号BCL-AGS2-21）で固相化したELISAプレートを、k-Block-eでブロッキングし、各種濃度の抗Pre-S2マウス抗体（特殊免疫研究所、2APS42）を添加した。次いで、終濃度が0.05%となるようにPluronic F-127が添加されたPBS-Tに溶解したHRP標識抗マウス抗体、HRP標識BNC-ZZ〔製造例3〕、又はこれらを同濃度で併用したものを添加し反応させ、洗浄後、実施例9と同様の方法にてAbs 450 nmを測定した。結果を図4に示す。

【0176】

図中、白三角印の「HRP-ZZ」に示すように、HRP標識BNC-ZZを利用する

と、図中、黒丸印の「2nd IgG」に示すように抗マウス抗体で検出した時と比べて10倍程度感度が上昇しており、図中、黒四角印の「HRP-ZZ+IgG」に示すようにこれらの両者を併用すると30倍程度も感度が上昇することが明らかとなった。

【0177】

実施例18

実施例17と同様に、HRP標識BNC-ZZの抗体検出型ELISAについて検討した。本実験で用いたリーシュマニア原虫の組換タンパク質とコントロールヒト抗血清は何れも愛知医科大学、感染・免疫学講座教室から提供を受けたものである。Pre-S2に代えてリーシュマニアの病原体である原虫の組換タンパク質を固相化したELISAプレートを、k-Block-eでブロッキングし、コントロールヒト抗血清の各種濃度を添加した。次いで、終濃度が0.05%となるようにPluronic F-127が添加されたPBS-Tに溶解したHRP標識抗ヒトIgG抗体、HRP標識BNC-ZZ〔製造例3〕、又はこれらを同濃度で併用したものを添加し反応させ、洗浄後、基質としてABTS (1-STEP ABTS, Thermo Scientific) にてAbs 405nmを測定した。結果を図5に示す。なお、測定値は抗体価をUnit/mLとして表した。

10

【0178】

図中、白四角印の「HRP-ZZ」に示すように、HRP標識BNC-ZZを利用すると、図中、黒三角印の「2nd IgG」に示すように抗ヒトIgG抗体で検出した時と比べて10倍弱感度が上昇しており、図中、黒丸印の「HRP-ZZ+IgG」に示すようにこれらの両者を併用すると30倍程度も感度が上昇することが明らかとなった。

20

【0179】

以上の実施例17及び18に示す結果から、HRP標識BNC-ZZは抗体検出型ELISAで高感度検出に有用であり、特に検出抗体と共存させると更に高感度での検出が可能ながことが判った。

【0180】

実施例19

HRP標識BNC-ZZのELISAにおける実践的測定を検討した。GFPタンパク質で固相化されたELISAプレートを、k-Block-eでブロッキングした。濃度が既知の抗GFPマウスIgG抗体をスタンダードとし、サンプルとしてマウス抗GFP抗血清を100倍以上に希釈したものを、それぞれ上記ELISAプレートの各ウェルに添加した。次いで、終濃度が0.05%となるようにPluronic F-127が添加されたPBSに溶解したHRP標識BNC-ZZ〔製造例3〕、ウサギ由来抗マウスIgG抗体とHRP標識BNC-ZZの混合複合体、又はウサギ由来HRP標識抗マウスIgG抗体をそれぞれ添加し反応させ、洗浄後、実施例9に示す方法と同様にAbs 450nmを測定した。測定した値は、スタンダード抗体で得られたそれぞれの検量線に基づいて、抗血清中の抗GFPマウスIgGの濃度を $\text{mean} \pm \text{std} (\text{ng/mL}, n=3)$ として計算した。

30

【0181】

その結果、HRP標識BNC-ZZ、HRP標識BNC-ZZと抗マウスIgGの混合複合体で測定した値は、それぞれ 15613 ± 936 、 15403 ± 1192 であり、HRP標識抗マウスIgG抗体で定量した 15400 ± 109 とよく一致し、十分な定量性を持つことが明らかとなった。

40

【0182】

実施例20

ALP標識BNC-ZZの抗体結合活性を評価するための実験を行った。コントロールウサギ由来IgGを用いて固相化したELISAプレートを1%のブロックエースでブロッキングし、各ウェルに上記製造例4にて作製した NH_2 -ALP標識BNC-ZZ又はSH-ALP標識BNC-ZZをBNC-ZZタンパク質量に換算してそれぞれ0、9.375、18.75、37.5、75、150、300、600ng/mLを50μLずつ各ウェルに添加し反応後、洗浄し、実施例2と同様の方法にてAbs 405nmを測定した。なお、ALP標識BNC-ZZと共に、終濃度が0.05%となるPluronic F-127を用いた。結果を図6に示す

50

。

【0183】

全てのBNC-ZZの濃度でSH-ALP標識BNC-ZZで得られた測定値の方がNH₂-ALP標識BNC-ZZのそれより高かった。600 ng/mLの濃度ではSH-ALP標識BNC-ZZで得られた測定値の方がNH₂-ALP標識BNC-ZZのそれより約1.7倍程度高かった。この倍率は、両者のALP比活性の違い（前者が5.61で後者が3.56 unit/μgであるので、1.6倍高い）とほぼ同じレベルであり、何れのALP標識BNC-ZZも固相化抗体にほぼ最大量結合していることが示唆された。一方、これより低い濃度では、SH-ALP標識BNC-ZZとNH₂-ALP標識BNC-ZZで得られた測定値の倍率は高くなり、BNC-ZZ濃度が37.5 ng以下では平均で3.6倍程度にまで高くなった。

10

【0184】

このことは、低濃度域ではSH-ALP標識BNC-ZZの方がより多く固相化抗体に結合したことを示唆している。ALPの比活性が1.6倍程度違うことを勘案するとSH-ALP標識BNC-ZZはNH₂-ALP標識BNC-ZZより、抗体に対する結合親和性が2.3倍強いと推定される。NH₂基経由の標識ではSH基を介した場合より抗体結合能が低下した原因は、上記実施例16に記載したHRP標識の場合と同じ原因であると考えられる。

【0185】

実施例21

ALP標識BNC-ZZのELISAへの応用を検討するための実験を行った。コントロールマウス由来IgG（ポリクローナル）で固相化されたELISAプレートを、0.5%のカゼインを用いてブロッキングした。各ウェルに各種濃度のSH-ALP標識BNC-ZZ〔製造例4〕又はALP標識ウサギ由来抗マウスIgG抗体を添加し反応させ、洗浄後、実施例2と同様の方法にてAbs 405 nmを測定した。

20

【0186】

なお、ALP標識BNC-ZZと共に、終濃度が0.05%となるようにPluronic F-127を用いた。その結果を図7に示す。

【0187】

ALP標識BNC-ZZを利用するとALP標識した抗体よりも遙かに高い反応が見られ、ALP標識BNC-ZZが高感度の抗体検出に有用であることが示唆された。

30

【0188】

実施例22

HRP標識AGG-BNC-ZZの抗体結合活性を評価するための実験を行った。コントロールブタ由来IgG（実施例5の方法で調製した自社製）を用いてELISAプレートを固相化し、次いで0.5%カゼインを用いてブロッキングした。各ウェルに図8のグラフ横軸に示した各種濃度のHRP標識AGG-BNC-ZZ〔製造例6〕又はNH₂-HRP標識BNC-ZZ〔製造例3〕をプローブとして添加し反応させ、洗浄後、実施例9と同様の方法でAbs 450 nmを測定した。なお、プローブには終濃度が0.05%となるようにPluronic F-127を加えた。結果を図8に示す。

40

【0189】

実施例3で示した様に、HRP標識AGG-BNC-ZZのHRP活性はHRP標識BNC-ZZの1/3であることが分かっているので、両プローブの抗体結合活性が同じと考えた場合、固相化したブタ由来IgGに対しHRP標識AGG-BNC-ZZはHRP標識BNC-ZZの1/3の反応を示すはずである。

【0190】

しかし、実際にはHRP標識AGG-BNC-ZZはHRP標識BNC-ZZと比べると、1/1.1~1/2.4程度の反応であった。このことはHRP標識AGG-BNC-ZZはHRP標識BNC-ZZより高い抗体結合活性を持つことを示している。以上の結果から、HRP標識AGG-BNC-ZZ及びHRP標識BNC-ZZはいずれも抗体

50

より優れた抗体結合活性を持つことを示している。

【0191】

実施例 2 3

H R P 標識 A G G - B N C - Z Z のプロテイン G 由来抗体結合能を評価するための実験を行った。実施例 2 2 に示すコントロールブタ由来 I g G に代えて B N C - Z Z では結合しにくいと考えられている、マウス由来 I g G₁ を用いて固相化し、その他は、同様の実験を行った。結果を図 9 に示す。

【0192】

H R P 標識 A G G - B N C - Z Z はマウス I g G₁ に対して高い結合反応を示した。一方、H R P 標識 B N C - Z Z では殆ど検出できなかった。このことは H R P 標識 A G G - B N C - Z Z のプロテイン G 由来の抗体結合部位がうまく機能しており、プロテイン A 由来の抗体結合部位では結合しにくい抗体に対しても H R P 標識 A G G - B N C - Z Z は高い結合力を有することを示している。

【0193】

実施例 2 4

H R P 標識 A G G - B N C - Z Z の E L I S A への応用実験を行った。大腸菌を利用して製造した G F P タンパク質を E L I S A プレートへ固相化し、次いで、k-Block-e を用いてブロッキングした。各ウェルへウサギ由来抗 G F P 抗体を図 1 0 のグラフ横軸に示した各種濃度で添加し、更に 1 0 0 n g / m L の H R P 標識 A G G - B N C - Z Z [製造例 6] 又は S H - H R P 標識 B N C - Z Z [製造例 3] をプローブとして加え反応させ、洗浄後、実施例 9 と同様の方法にて A b s 4 5 0 n m を測定した。なお、プローブには終濃度が 0 . 0 5 % となるように Pluronic F-127 を加えた。結果を図 1 0 に示す。

【0194】

H R P 標識 A G G - B N C - Z Z は対照として用いた S H - H R P 標識 B N C - Z Z と同じく、添加した抗体濃度に依存した反応を示したが、前者の反応は後者に比べると約 1 / 2 であった。H R P 標識 A G G - B N C - Z Z の H R P 活性が H R P 標識 B N C - Z Z の 1 / 3 であることを考慮すると、H R P 標識 A G G - B N C - Z Z は H R P 標識 B N C - Z Z 以上の反応を示すことが分かった。

【0195】

次いでウサギ由来抗 G F P 抗体に代えて、マウス由来抗 H M G 1 モノクローナル抗体 (コスモバイオ ; I g G₁) を用いて固相化処理を行い、それ以外は同様の方法で実験を行った。結果を図 1 1 に示す。

【0196】

H R P 標識 A G G - B N C - Z Z を検出プローブとして利用した場合、添加した抗体濃度に依存した反応を示したが、H R P 標識 B N C - Z Z の場合には反応は殆ど見られなかった。

【0197】

以上の結果は実践的な測定系においても H R P 標識 A G G - B N C - Z Z は抗体検出型 E L I S A にて利用可能であることを示している。また、H R P 標識 A G G - B N C - Z Z は H R P 標識 B N C - Z Z では検出できないマウス I g G₁ も検出できることを示しており、非常に有用性が高いことを示している。

【0198】

実施例 2 5

H R P 標識 B N C - Z Z / ウサギ由来抗マウス I g G 抗体複合体の抗体結合活性を検討するための実験を行った。コントロールマウス由来 I g G を用いて、E L I S A 用プレートを固相化し、次いで、k-Block-e で 1 時間反応させてブロッキングした。各ウェルに架橋剤 B S₃ を用いて製造した H R P 標識 B N C - Z Z / ウサギ由来抗マウス I g G 抗体の複合体 [製造例 7] のうち、架橋剤 B S₃ 濃度が 2 0 0 μ M 及び 1 0 0 0 μ M で作製したものを、それぞれ 0、0 . 5 5、1 . 6 5、4 . 9 4、1 4 . 8、4 4 . 4、1 3 3、4 0 0 n g / m L の濃度のものをプローブとして添加し反応させ、洗浄後、実施例 9 と同様

の方法でAbs 450nmを測定した。なお、プローブには終濃度が0.05%となるようにPluronic F-127を加えた。結果を図12に示す。

【0199】

用いた両複合体の濃度に依存した反応が見られた。複合体調製時の架橋剤が200μMと1000μMを比較すると、後者は結合活性が若干低下したが、両者とも実用レベルの抗体結合活性を示した。

【0200】

実施例26

卵白アルブミン(OVA)を免疫して得られた抗OVAマウス抗血清中に存在する抗OVAマウスIgE、抗OVAマウスIgGの両者を実践的に測定できるかどうかを確認した。OVAをELISAプレートに固相化し、次いでh-Block-eを用いてブロッキングした。このプレートに各抗OVAマウス抗血清を100倍以上に希釈したものを加えた。IgE測定用プローブとして、SH-HRP標識BNC-ZZ〔製造例3〕と抗マウスIgE(Nordic immunology Lab)を〔製造例7〕の方法に従いBS₃濃度を1000μMとして調製した複合体と、HRP標識抗マウスIgEを用いた。IgG測定用プローブとしてはSH-HRP標識BNC-ZZ〔製造例3〕とウサギ由来抗マウスIgG抗体の混合複合体を用いた。それぞれの測定に用意したプレートのウェルにこれらのプローブを添加し反応させ、洗浄後、実施例9と同様の方法でAbs 450nmを測定した。測定値はスタンダード抗体を用いて作製した検量線を用い、スタンダード抗体の抗体価を基準にして各抗体の抗体価を、mean±std(unit/mL, n=3)で算出した。

【0201】

マウス血清中の抗OVA IgEの抗体価はHRP標識BNC-ZZ/抗マウスIgE複合体を用いた場合が3807±1439 unit/mLであり、HRP標識抗マウスIgEを用いた場合が3558±935 unit/mLであり、両者は同様の値を示した。

【0202】

また、抗OVAマウスIgGの抗体価は4175±8717 unit/mLであった。以上、これらの複合体を利用した測定系ではIgEやIgGの抗体価測定が十分に可能であり、実践的な有用性を持つことが分かった。

【0203】

実施例27

〔製造例8〕で調製したHRP標識BNC-SA/ウサギ由来抗マウスIgG抗体の複合体を利用し、マウスIgGに対する結合反応を確認する実験を行った。コントロールマウス由来IgGをELISAプレートに固相化し、次いで1%のブロックエースを用いてブロッキングした。各ウェルにプローブとしてHRP標識BNC-SA/ウサギ由来抗マウスIgG抗体複合体〔製造例8〕、及び対照としてNH₂-HRP標識BNC-ZZ〔製造例3〕と抗マウスIgGウサギ抗体(Bethyl)の混合複合体並びにウサギ由来HRP標識抗マウスIgG抗体の各プローブを、それぞれ0、0.55、1.65、4.94、14.8、44.4、133、400ng/mLの濃度で添加し反応させ、洗浄後、実施例9と同様の方法でAbs 450nmを測定した。なお、プローブには終濃度が0.05%となるようにPluronic F-127を加えた。その結果を図13に示す。

【0204】

いずれのプローブも加える濃度に依存して反応は大きくなった。HRP標識BNC-SA/抗体複合体は、同じNH₂基を介してHRPを標識したHRP標識BNC-ZZと抗体の混合複合体と比較して約1/2の結合活性を示した。HRPの酵素活性は前者が約1/3であることを考えると、HRP標識BNC-SA/抗体複合体はNH₂-HRP標識BNC-ZZと抗体の混合複合体より抗体への結合能は高いことを示す。一方HRP標識抗体と比較した場合、HRP標識BNC-SA/抗体複合体は、約2倍の反応を示した。以上、HRP標識BNC-SA/抗体複合体はHRP標識抗マウスIgG抗体より抗体への結合能が高く、有用性があることが分かった。

【0205】

実施例 28

実施例 13 の方法と同様に、HuH7 細胞の抽出液をウェスタンブロットに供した。メンブレンのブロッキングは 5 % のスキムミルクを用い、使用した一次抗体はマウス由来抗 vimentin 抗体 (Progen、1/1000 希釈) である。プローブとして 1 % スキムミルクを含有するウサギ由来 HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Rockland、1/10000; 図中の 2nd Ab)、又は 0.1 % の Pluronic F-127 及び 1 % スキムミルクを含有する HRP 標識 BNC-ZZ [製造例 3] を用いた。結果を図 14 に示す。

【0206】

プローブとしてウサギ由来 HRP 標識抗マウス IgG 抗体を用いて検出した場合、抽出液を 1/10 に希釈するとバンドのシグナルが確認できなかったが、HRP 標識 BNC-ZZ を用いた場合には、1/10 に希釈の抽出液でも同等のシグナルが得られた。したがって、HRP 標識 BNC-ZZ が高感度検出に有効であることが分かる。

10

【0207】

実施例 29

実施例 28 と同様の方法でウェスタンブロットを行った。1 次抗体として用いた上記抗 vimentin マウス抗体を 1/3000 希釈とし、2 次抗体として HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Rockland、#611-1302、1/10000 希釈) で検出し (図中の Detect-1)、その後、更に、0.1 % Lipidure 802 を含む溶液に溶解して HRP 標識 BNC-ZZ を追加プローブとして検出した (図中の Detect-2)。結果を図 15 に示す。

20

【0208】

2 次抗体として用いた HRP 標識抗マウス抗体では検出感度が悪い場合 (Detection-1)、HRP 標識 BNC-ZZ を追加プローブとして用いて再検出 (Detection-2) するだけでバンドシグナルを強めることができたことが分かる。なお、データは示していないが 2 次抗体を追加してもシグナルは殆ど上昇しなかった。従って、HRP 標識 BNC-ZZ は追加するだけでシグナルを増感できるため非常に有用性が高い。

【0209】

実施例 30

実施例 28 と同様の方法で、ウェスタンブロットを行った。1 次抗体として抗 vimentin マウス抗体 (Progen、1/2000 希釈)、抗 GAPDH ウサギ抗体 (EPITOMICS、1/10000 希釈)、又はこれらの両者を用い、2 次抗体として HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Rockland)、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Santa Cruz)、又は HRP 標識 BNC-ZZ (HRP-ZZ) を用いて検出した結果である。なお、HRP 標識 BNC-ZZ は終濃度が 0.1 % となる量の Pluronic F-127 と共に用いた。結果を図 16 に示す。

30

【0210】

HRP 標識 BNC-ZZ を利用した場合、それぞれの 2 次抗体で検出した位置に、一度で vimentin と GAPDH を検出することが出来ることが分かる。また、HRP 標識 BNC-ZZ の場合は、抗体の由来する動物種が異なっても同等に同時に検出できることも示された。

【0211】

実施例 31

サンプルとして HuH7 細胞抽出液に 2 倍の希釈系列で濃度調製した GFP-Histag タンパク質を添加し、これを実施例 28 と同様の方法でウェスタンブロッティングに供した。1 次抗体として抗 GAPDH ウサギ抗体 (EPITOMICS、1/10000) 及び抗 GFP ウサギ抗体 (Rockland、1/2000) と反応させ、その後、0.1 % の Lipidure 206 を含有する PBS-T で希釈した HRP 標識 BNC-ZZ (HRP-ZZ) を用いて同時に検出した。結果を図 17 に示す。

40

【0212】

HRP 標識 BNC-ZZ を利用した場合、GFP タンパク質は添加した濃度に従ってシグナルは増強し、定量性があることが分かった。

50

【0213】

実施例 3 2

実施例 2 8 と同様の方法で、ウエスタンブロットを行った。抗vimentinマウス抗体 (Pr ogen、1/2000) と H R P 標識 B N C - Z Z を予め等量混合し、その混合複合体を P V D F 膜へ加えることでワンステップ法により検出した。なお、H R P 標識 B N C - Z Z と抗体の混合複合体の反応液は 0. 1 % Pluronic F-127 を含有する T B S - T を用いた。対照として抗Vimentinマウス抗体との反応の後に、H R P 標識抗マウス抗体 (Rockland、1/5000) で反応を行った 2 ステップ操作によっても検出した。結果を図 1 8 に示す。ワンステップ法は、P V D F 膜へのタンパク質のトランスファーの後、検出までの操作時間として、ブロッキングに 5 分 (図中の Q 1) 又は 1 5 分 (図中の Q 2)、次いで行う洗浄に 5 分、次いで行う反応 (一次抗体 + H R P 標識 B N C - Z Z) に 3 0 分、次いで行う洗浄に 2 5 分 (5 分 × 5 : Q 1) 又は 1 5 分 (3 分 × 5 : Q 2) で、総時間が 6 5 分程度であるのに対し、H R P 標識抗マウス抗体を用いた 2 ステップ法 (図中の M) ではブロッキングに 6 0 分、次いで行う洗浄に 1 0 分 (5 分 × 2)、次いで行う 1 次抗体反応に 6 0 分、次いで行う洗浄に 1 5 分 (5 分 × 3)、次いで行う 2 次抗体反応に 6 0 分、次いで行う洗浄に 2 5 分 (5 分 × 5) で、総時間が 2 3 0 分程度であった。

10

【0214】

通常法の 2 ステップ法では、タンパク質転写膜を利用してシグナルを検出するまで合計 2 3 0 分の工程が必要であったが、H R P 標識 B N C - Z Z を利用したワンステップ法 (図中の Q 1, Q 2) の場合、洗浄時間やその他の時間を短縮することで 6 5 分に短縮して同等の結果を得ることができた。したがって、H R P 標識 B N C - Z Z は迅速検出ウエスタンブロットを可能とする有用性を持つことがわかった。

20

【0215】

実施例 3 3

実施例 2 8 と同様の方法で、ウエスタンブロットを行った。1 次抗体として抗 p 5 3 ウサギ抗体 (Santa Cruz、1/200) を、2 次抗体として A L P 標識抗ウサギ I g G 抗体 (Sigma、1/50000)、又は S H - A L P 標識 B N C - Z Z [製造例 4] を用い、A L P 用基質として CDP-Star (NEB) を採用した。結果を図 1 9 に示す。

【0216】

A L P 標識抗ウサギ I g G 抗体で検出した場合と A L P 標識 B N C - Z Z で検出した場合ではほぼ同等のシグナルが得られ、A L P 標識 B N C - Z Z はウエスタンブロットでも有用性の高いプローブであり、H R P 標識 B N C - Z Z を用いた本願の実施例で示した種々の使用法が可能であることが示唆された。

30

【0217】

実施例 3 4

実施例 2 8 と同じ方法で、ただし A 4 3 1 細胞抽出液に代えてウエスタンブロットを行った。1 次抗体として抗体種がマウス I g G₁ である抗 E G F R 抗体 (Cell Singnaling、1/1000 希釈)、又は抗 p 5 3 ウサギ抗体 (Santa Cruz、1/200 希釈) と反応させた後、0. 1 % の Pluronic F-127 含有する T B S - T で希釈した H R P 標識 A G G - B N C - Z Z [製造例 6] 又は H R P 標識 B N C - Z Z [製造例 3] で反応させた。結果を図 2 0 に示す。

40

【0218】

マウス I g G₁ である抗 E G F R 抗体を用いた場合には、H R P 標識 B N C - Z Z (図中の Z) では全く検出できなかったが、H R P 標識 A G G - B N C - Z Z (図中の A) を利用した場合には検出が可能であった。一方、ウサギ I g G である抗 p 5 3 抗体を利用した場合には、H R P 標識 B N C - Z Z を用いても H R P 標識 A G G - B N C - Z Z を用いてもよく検出できた。

【0219】

以上の結果は、H R P 標識 A G G - B N C - Z Z はプロテイン G 由来の抗体結合部位を持つためマウス I g G₁ にも容易に結合し、H R P 標識 B N C - Z Z はプロテイン A 由来

50

の抗体結合部位のみを持つためマウス IgG₁には殆ど結合しないこととよく一致し、HRP標識AGG-BNC-ZZの有用性が証明された。

【0220】

〔製造例9：HRP標識BNC-Lの調製〕

Peroxidase Labeling Kit-SHを用いて、BNC-L〔製造例1〕のSH基を介してHRP標識を施し、HRP標識BNC-Lを得た。

【0221】

実施例35

B型肝炎ウイルスの表面抗原のペプチドであるPre-S2を固相化したELISAプレートをブロッキングし、各ウェルに各種濃度の抗Pre-S2抗体を添加した。次いで、HRP標識BNC-L〔製造例9〕を添加し反応させ、洗浄後、実施例9に示す方法にてAbs450nmを測定した（抗原サンドイッチELISA）。その結果を図21に示す。

10

【0222】

その結果、HRP標識BNC-LはELISA測定のプロープとして十分に用い得ることが明らかとなった。

【0223】

〔製造例10：SH-HRP標識BNC-（糖鎖）-AGG〕

BNC-L〔製造例1〕をNaIO₄で酸化処理し、BNC-Lに付加された糖鎖中の糖残基にアルデヒド基を形成させた。次いでAGGタンパク質と反応させて、アルデヒド基とAGGペプチドのリジン残基を結合させた。反応物にNaBH₄溶液を添加し、ゲル濾過処理に供してBNC-AGGを得た。更に、Peroxidase Labeling Kit-SHを用いて、得られたBNC-AGGのSH基を介してHRP標識を施した。すなわち、得られたBNCは、その糖鎖を介してAGGが結合しており、更に、そのSH基を介してHRPが結合している（以後、SH-HRP標識BNC-（糖鎖）-AGGと呼ぶことがある。）。

20

【0224】

実施例36

各種濃度のウサギIgGで固相化されたELISAプレートをブロッキングし、各ウェルにSH-HRP標識BNC-（糖鎖）-AGG〔製造例10〕を添加し反応させ、洗浄後、実施例9に示す方法にてAbs450nmを測定した。結果を図22に示す。

【0225】

SH-HRP標識BNC-（糖鎖）-AGGによるAbs450nm値は、対照として用いたSH-HRP標識BNC-ZZ〔製造例4〕と比べて低かったものの、十分な検出能を有することが分かった。

30

【0226】

〔製造例11：HRP標識HVJ-Eの調製〕

Peroxidase Labeling Kit-SHを用いて、センダイウイルスのエンベローブタンパク質を含むウイルス様粒子であるHVJ-E（Genome One，石原産業）の粒子表面に存在するタンパク質のシステイン残基におけるSH基を介してHRPを標識し、HRP標識HVJ-Eを得た。

【0227】

実施例37

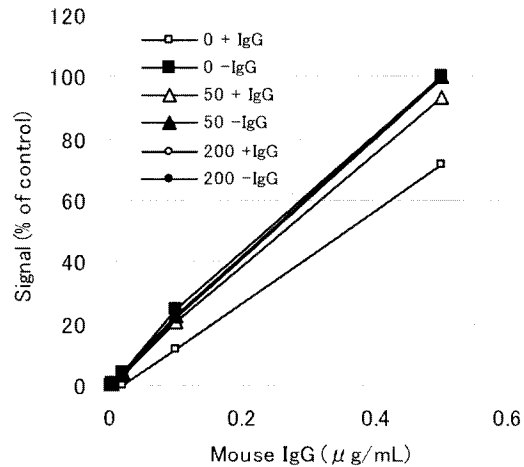
実施例1と同様の方法にて、HRP標識HVJ-EのHRP活性〔製造例11〕を測定したところ、0.05U/μgであった。

40

【0228】

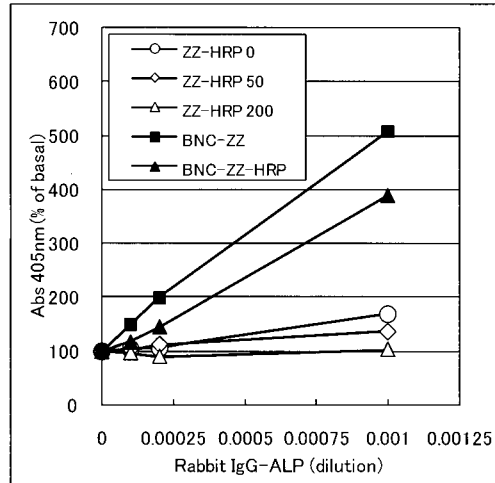
膜貫通型のタンパク質を持つウイルス様粒子では、タンパク質の膜貫通領域内又は近傍にSH基を有する場合が多い。本実施例ではHVJ-EにおいてもSH基を介した標識が可能であることを示しており、ウイルス様粒子に存在するSH基は標識のターゲットとして有用であることを示している。

【図 1】



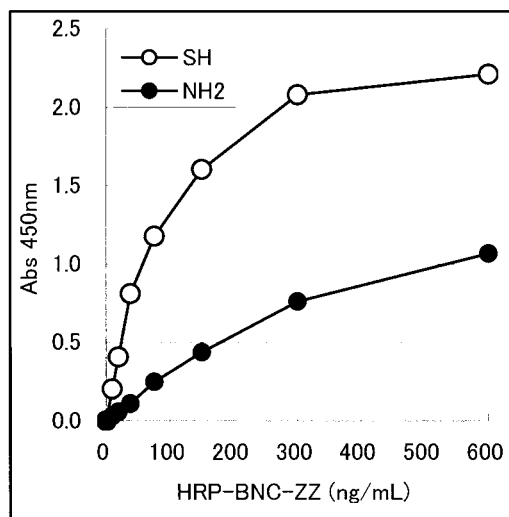
Sample	BS ₃ (μM)	Rabbit IgG (60 ng/mL)
0 + IgG	0	+
0 - IgG	0	-
50 + IgG	50	+
50 - IgG	50	-
200 + IgG	200	+
200 - IgG	200	-

【図 2】



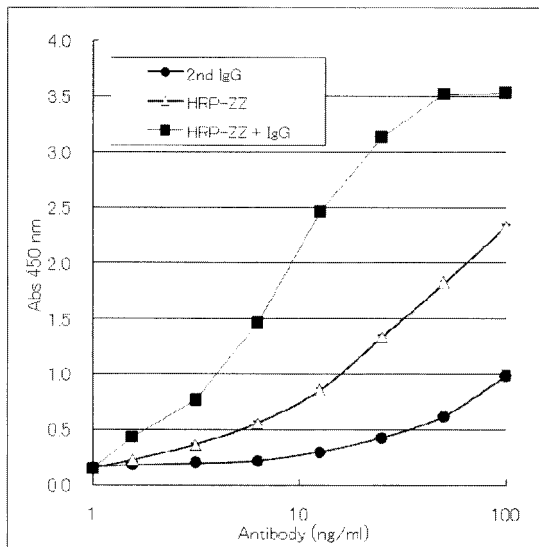
Sample	HRP-label	BS ₃ (μM)	IgG
ZZ-HRP 0	+	-	+
ZZ-HRP 50	+	50	+
ZZ-HRP 200	+	200	+
BNC-ZZ	-	-	-
ZZ-HRP	+	-	-

【図 3】

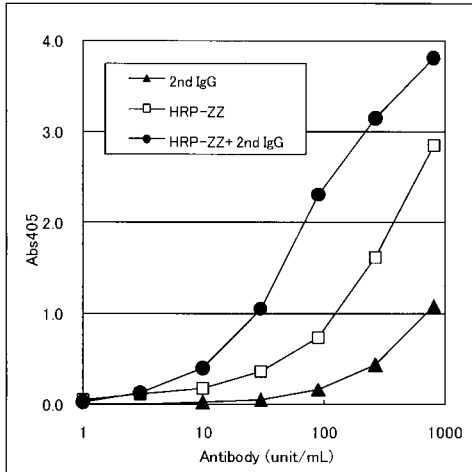


BNC-ZZ (ng/mL)	Abs 450nm SH	Abs 450nm NH ₂	fold SH/NH ₂
600	2.21	1.07	2.07
300	2.08	0.76	2.73
150	1.60	0.44	3.68
75	1.18	0.25	4.74
37.5	0.81	0.11	7.43
18.75	0.41	0.06	7.12
9.375	0.20	0.03	7.18

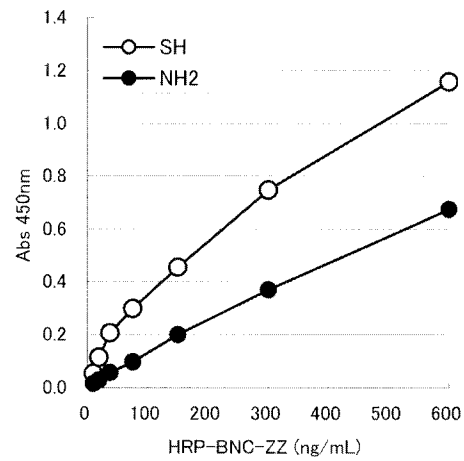
【図 4】



【図 5】

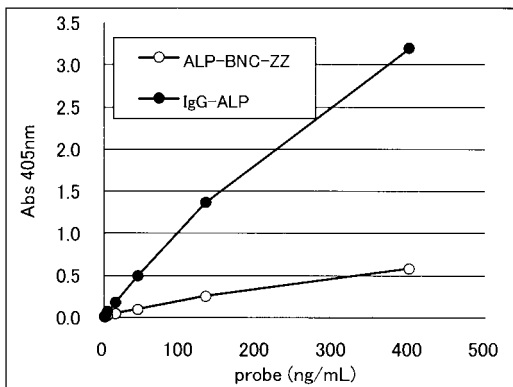


【図 6】

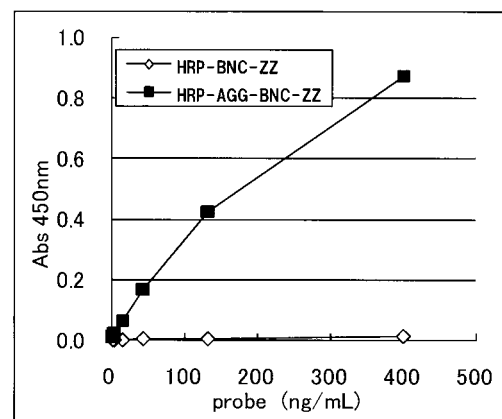


BNC-ZZ (ng/mL)	Abs 450nm SH	Abs 450nm NH ₂	fold SH/NH ₂
600	1.16	0.68	1.72
300	0.75	0.37	2.03
150	0.46	0.20	2.28
75	0.30	0.10	3.04
37.5	0.21	0.06	3.53
18.75	0.11	0.03	3.84
9.375	0.05	0.02	3.40

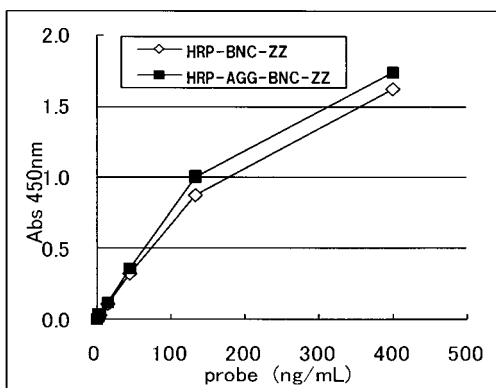
【図 7】



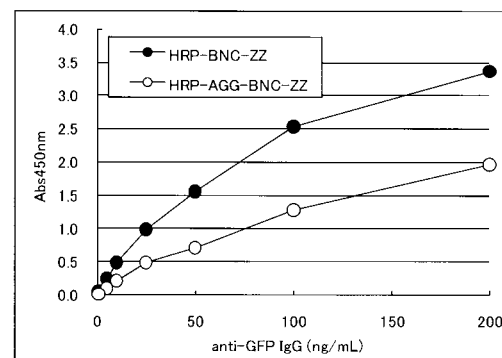
【図 9】



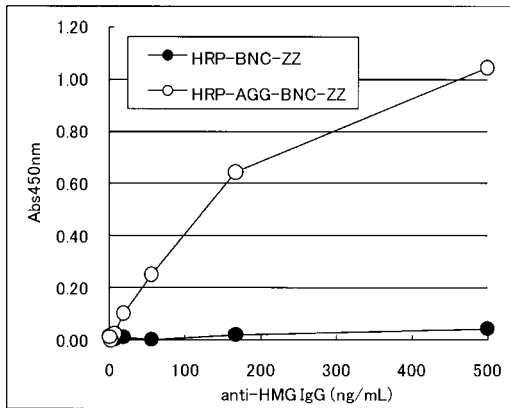
【図 8】



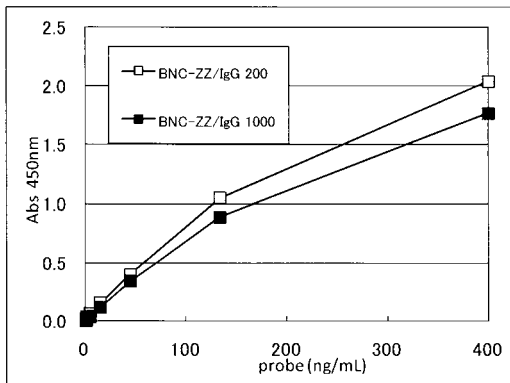
【図 10】



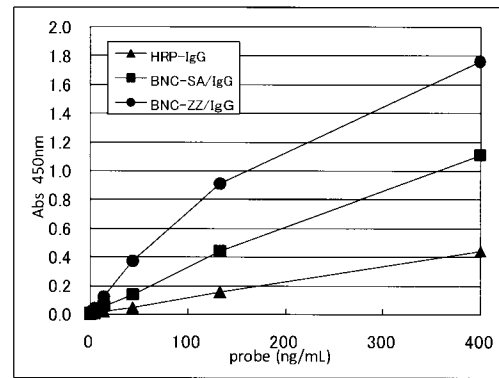
【図 1 1】



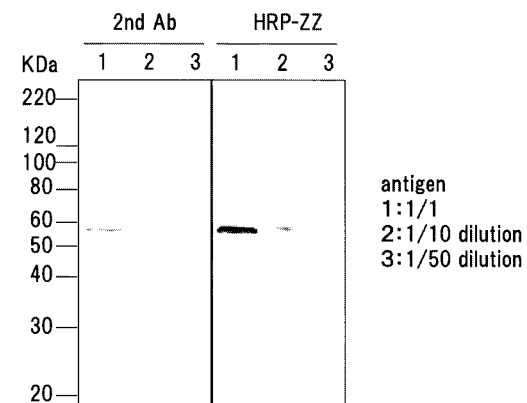
【図 1 2】



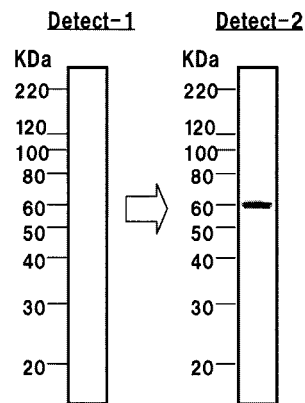
【図 1 3】



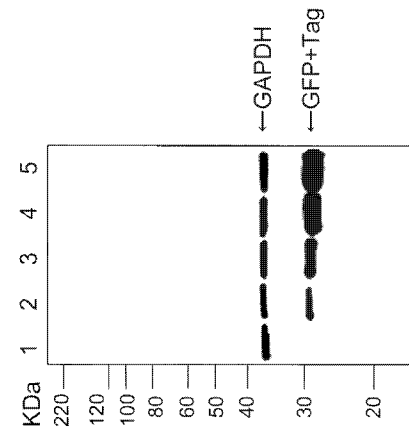
【図 1 4】



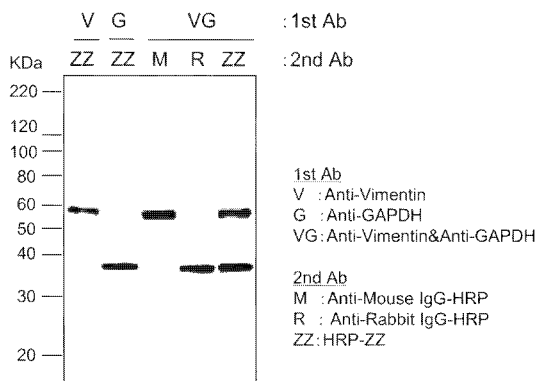
【図 1 5】



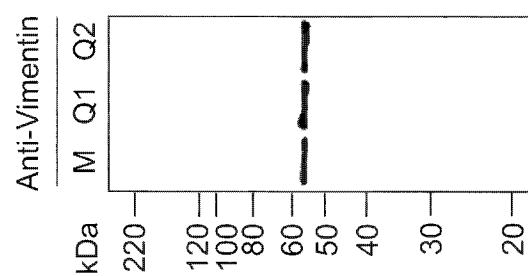
【図 1 7】



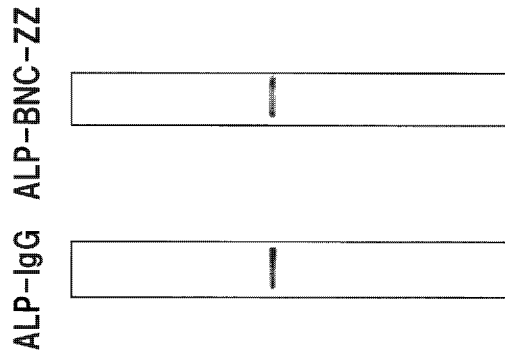
【図 1 6】



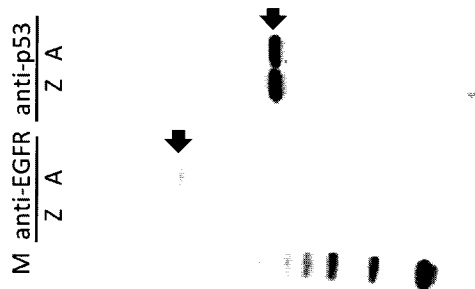
【図 1 8】



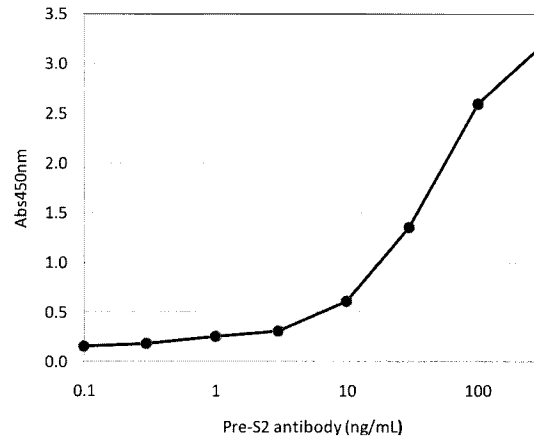
【図 19】



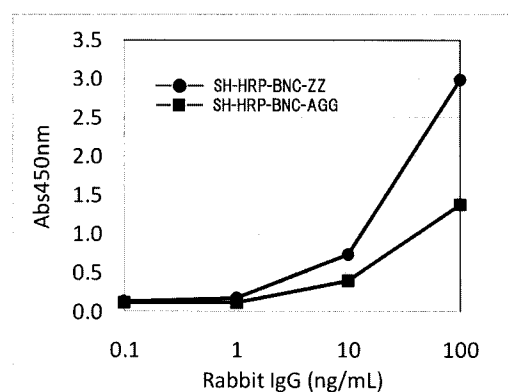
【図 20】



【図 21】



【図 22】



【配列表】

2016017037000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年8月12日(2015.8.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

自己組織化能を有するタンパク質を含む免疫学的測定用ウイルス様粒子であって、該自己組織化能を有するタンパク質の少なくとも1つのシステイン残基のチオール基を介して酵素によって修飾されてなる、ウイルス様粒子。

【請求項2】

前記自己組織化能を有するタンパク質がHBsAタンパク質である、請求項1に記載のウイルス様粒子。

【請求項3】

前記自己組織化能を有するタンパク質が配列番号1に示すアミノ酸配列を含む請求項1のウイルス様粒子。

【請求項4】

前記自己組織化能を有するタンパク質が抗体結合ドメインを有する、請求項1～3の何れか1項に記載のウイルス様粒子。

【請求項5】

前記酵素が、ペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼからなる群より選択される

何れかである請求項 1～4 のいずれかに記載のウイルス様粒子。

【請求項 6】

前記抗体結合ドメインが、プロテイン A 中の抗体結合ドメイン、プロテイン G 中の抗体結合ドメイン、及びプロテイン L 中の抗体結合ドメインからなる群より選択される少なくとも一種である、請求項 4 又は 5 に記載のウイルス様粒子。

【請求項 7】

前記抗体結合ドメインが、配列番号 3～5 の何れかに示されるアミノ酸配列からなる請求項 4 又は 5 に記載のウイルス粒子。

【請求項 8】

請求項 1～7 の何れか 1 項に記載のウイルス様粒子を用いた免疫学的測定用ブロッキング剤であって、当該ブロッキング剤が、ヒドロキシアルキルセルロース、ポリビニルアルコール、エチレンオキサイド／プロピレンオキサイド共重合体、及び 2-メタクリロイルオキシエチルホスホコリンで構成される共重合体からなる群より選択される少なくとも 1 種を含むブロッキング剤。

【請求項 9】

前記エチレンオキサイド／プロピレンオキサイド共重合体が、プルロニック（登録商標）である請求項 8 に記載のブロッキング剤。

【請求項 10】

2-メタクリロイルオキシエチルホスホコリンで構成される共重合体が、バイオリピジュア（登録商標）である、請求項 8 に記載のブロッキング剤。

【請求項 11】

請求項 1～7 の何れか 1 項に記載のウイルス様粒子と請求項 8～10 の何れか 1 項に記載のブロッキング剤を含む免疫学的測定用キット。

【手続補正 2】

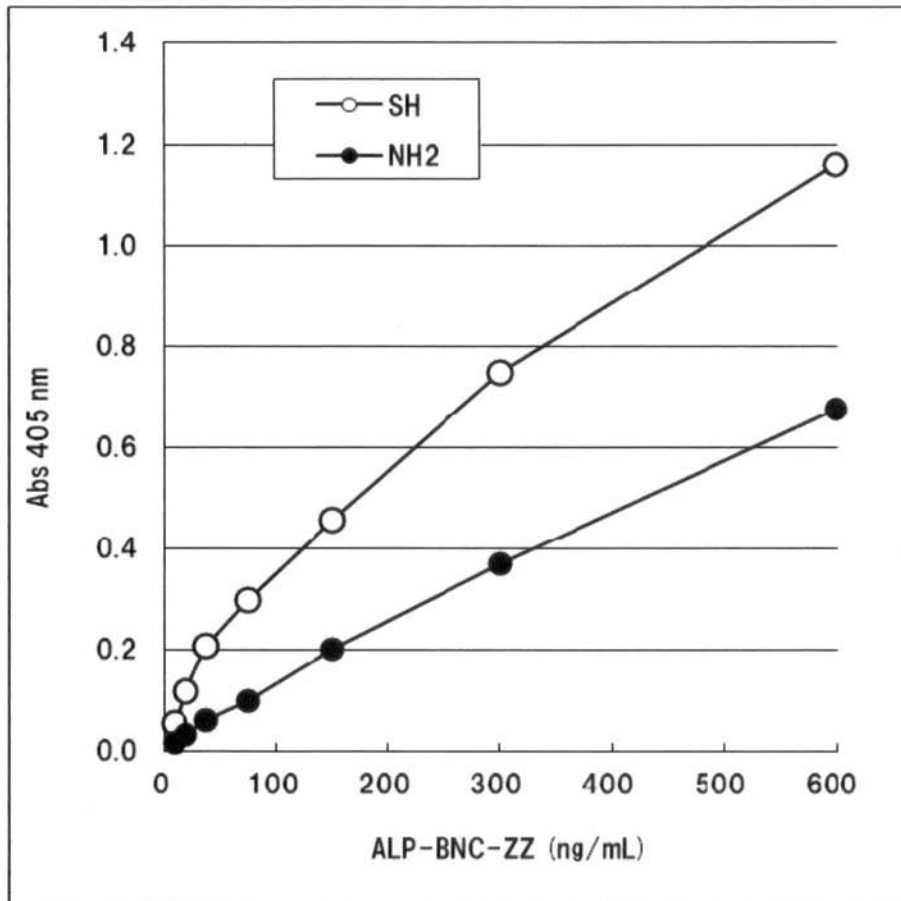
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 6】



BNC-ZZ (ng/mL)	Abs 450 nm SH	Abs 450 nm NH ₂	fold SH/NH ₂
600	1.16	0.68	1.72
300	0.75	0.37	2.03
150	0.46	0.20	2.28
75	0.30	0.10	3.04
37.5	0.21	0.06	3.53
18.75	0.11	0.03	3.84
9.375	0.05	0.02	3.40

【手続補正書】

【提出日】平成27年10月14日(2015.10.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

自己組織化能を有するタンパク質を含む免疫学的測定用ウイルス様粒子であって、該自己組織化能を有するタンパク質がHBsAgタンパク質であり、該自己組織化能を有するタンパク質の少なくとも1つのシステイン残基のチオール基を介して酵素によって修飾されてなる、ウイルス様粒子。

【請求項 2】

前記自己組織化能を有するタンパク質が配列番号 1 に示すアミノ酸配列を含む、請求項 1 のウイルス様粒子。

【請求項 3】

前記自己組織化能を有するタンパク質が抗体結合ドメインを有する、請求項 1 または 2 に記載のウイルス様粒子。

【請求項 4】

前記酵素が、ペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼからなる群より選択される何れかである、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のウイルス様粒子。

【請求項 5】

前記抗体結合ドメインが、プロテイン A 中の抗体結合ドメイン、プロテイン G 中の抗体結合ドメイン、及びプロテイン L 中の抗体結合ドメインからなる群より選択される少なくとも一種である、請求項 1 ～ 4 のいずれか に記載のウイルス様粒子。

【請求項 6】

前記抗体結合ドメインが、配列番号 3 ～ 5 の何れかに示されるアミノ酸配列からなる、請求項 1 ～ 5 のいずれか に記載のウイルス様粒子。

【手続補正書】

【提出日】平成27年11月18日(2015.11.18)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

自己組織化能を有するタンパク質を含む免疫学的測定用ウイルス様粒子であって、該自己組織化能を有するタンパク質が H B s A g タンパク質であり、該自己組織化能を有するタンパク質の少なくとも 1 つのシステイン残基のチオール基を介して酵素によって修飾されてなる、ウイルス様粒子。

【請求項 2】

前記自己組織化能を有するタンパク質が配列番号 1 に示すアミノ酸配列を含む、請求項 1 のウイルス様粒子。

【請求項 3】

前記自己組織化能を有するタンパク質が抗体結合ドメインを有する、請求項 1 または 2 に記載のウイルス様粒子。

【請求項 4】

前記酵素が、ペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼからなる群より選択される何れかである、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のウイルス様粒子。

【請求項 5】

前記抗体結合ドメインが、プロテイン A 中の抗体結合ドメイン、プロテイン G 中の抗体結合ドメイン、及びプロテイン L 中の抗体結合ドメインからなる群より選択される少なくとも一種である、請求項 3 に記載のウイルス様粒子。

【請求項 6】

前記抗体結合ドメインが、配列番号 3 ～ 5 の何れかに示されるアミノ酸配列からなる、請求項 3 に記載のウイルス様粒子。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/070396

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N7/00(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C12N7/00, G01N33/53

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2008-191143 A (Toray Industries, Inc.), 21 August 2008 (21.08.2008), claims; examples; paragraphs [0026], [0027], [0041], [0043] (Family: none)	1, 2, 4-6, 8/3, 7, 9-12
Y	JP 2001-066309 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 16 March 2001 (16.03.2001), sequence no.12 (Family: none)	1-12
Y	JP 2014-100095 A (Kyushu University), 05 June 2014 (05.06.2014), sequence no.4 to 6 (Family: none)	1-12

☒ 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
10 November, 2014 (10.11.14)Date of mailing of the international search report
18 November, 2014 (18.11.14)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/070396

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2013/041730 A1 (Universitat Stuttgart), 28 March 2013 (28.03.2013), sequence no.17 (Family: none)	1-12
Y	WO 2005/001480 A1 (PROTEOME SYSTEMS INTELLECTUAL PROPERTY PTY LTD.), 06 January 2005 (06.01.2005), sequence no.3 & EP 1642136 A1 & US 2007-0178541 A1	1-12
Y	JP 2005-500257 A (Dakocytomation Denmark A/S), 06 January 2005 (06.01.2005), paragraph [0237] & EP 1377609 A2	1-12
Y	YAMAMOTO S et al., In situ fabrication of ionic polyacrylamide-based preconcentrator on a simple poly(methyl methacrylate) microfluidic chip for capillary electrophoresis of anionic compounds, Anal Chem., 2008, Vol.80, p.8224- 8230	1-12

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 7 0 3 9 6										
A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N7/00(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i												
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N15/09, C12N7/00, G01N33/53												
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2014年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2014年	日本国実用新案登録公報	1996-2014年	日本国登録実用新案公報	1994-2014年	
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2014年											
日本国実用新案登録公報	1996-2014年											
日本国登録実用新案公報	1994-2014年											
国際調査で利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） CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq												
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 請求項の番号										
X/Y	JP 2008-191143 A（東レ株式会社）2008.08.21, 特許請求の範囲、実施例、【0026】、【0027】、【0041】、【0043】（ファミリーなし）	1, 2, 4-6, 8/3, 7, 9-12										
Y	JP 2001-066309 A（積水化学工業株式会社）2001.03.16, 配列番号12（ファミリーなし）	1-12										
Y	JP 2014-100095 A（国立大学法人九州大学）2014.06.05, 配列番号4-6（ファミリーなし）	1-12										
☒ 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。												
<table border="0"> <tr> <td> * 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 </td> <td> 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 </td> </tr> </table>				* 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							
* 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 10.11.2014		国際調査報告の発送日 18.11.2014										
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		<table border="1"> <tr> <td>特許庁審査官（権限のある職員）</td> <td>4 N</td> <td>4 8 6 8</td> </tr> <tr> <td>北田 祐介</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>電話番号 03-3581-1101 内線</td> <td colspan="2">3488</td> </tr> </table>		特許庁審査官（権限のある職員）	4 N	4 8 6 8	北田 祐介			電話番号 03-3581-1101 内線	3488	
特許庁審査官（権限のある職員）	4 N	4 8 6 8										
北田 祐介												
電話番号 03-3581-1101 内線	3488											

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 7 0 3 9 6
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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 請求項の番号
Y	WO 2013/041730 A1 (Universitat Stuttgart) 2013.03.28, 配列番号 1 7 (ファミリーなし)	1-12
Y	WO 2005/001480 A1 (PROTEOME SYSTEMS INTELLECTUAL PROPERTY PTY LTD) 2005.01.06, 配列番号 3 & EP1642136 A1 & US 2007-0178541 A1	1-12
Y	JP 2005-500257 A (ダコサイトメーション・デンマーク・アクティールズカブ) 2005.01.06, 【0 2 3 7】 & EP 1377609 A2	1-12
Y	YAMAMOTO S et al., In situ fabrication of ionic polyacrylamide-based preconcentrator on a simple poly(methyl methacrylate) microfluidic chip for capillary electrophoresis of anionic compounds, Anal Chem., 2008, Vol.80, p.8224-8230	1-12

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/543 (2006.01) G 0 1 N 33/543 5 4 5 J

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

Fターム(参考) 4B065 AA96X AA96Y AB01 AC12 AC14 BA01 CA24 CA46

(注) この公表は、国際事務局(W I P O)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	用于免疫测定方法的病毒样颗粒，用于其的阻断剂和含有它们的试剂盒		
公开(公告)号	JPWO2016017037A1	公开(公告)日	2017-04-27
申请号	JP2015540381	申请日	2014-08-01
申请(专利权)人(译)	有限公司车辆		
[标]发明人	郷保正 織田康則		
发明人	郷 保正 織田 康則		
IPC分类号	G01N33/544 C12N15/09 C12N7/00 C12M1/34 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	C07K14/005 C07K2319/705 C12N2730/10122 C12N2730/10123 C12N2760/18823 G01N33/544 G01N2333/02 C07K14/195 C07K14/31 C07K14/315 G01N33/54346 G01N33/56905 G01N33/56966 G01N33/56983 G01N2333/44 G01N2333/71		
FI分类号	G01N33/544.Z C12N15/00.ZNA.A C12N7/00 C12M1/34.F G01N33/53.M G01N33/543.545.J		
F-TERM分类号	4B024/AA14 4B024/BA33 4B024/CA06 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA15 4B029 /AA07 4B029/BB13 4B029/CC01 4B029/FA11 4B029/GB09 4B065/AA96X 4B065/AA96Y 4B065/AB01 4B065/AC12 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA46		
其他公开文献	JP5867890B1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明具有优良的检测灵敏度的，其目的在于提供一种抑制显著免疫测定检测的背景。解决手段是病毒样颗粒，病毒样颗粒包含具有自组织能力的蛋白质，并且通过自组织能力蛋白的至少一个半胱氨酸残基的巯基像用生物活性分子修饰的颗粒一样。

(19) 日本国特許庁 (JP)		再 公 表 特 許 (A1)		(11) 国際公開番号 WO2016/017037	
発行日 平成29年4月27日 (2017. 4. 27)		(43) 国際公開日		平成28年2月4日 (2016. 2. 4)	
(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)	
GO 1 N 33/544 (2006. 01)		GO 1 N 33/544 Z		4 B 0 2 4	
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)		C 1 2 N 15/00 Z N A A		4 B 0 2 9	
C 1 2 N 7/00 (2006. 01)		C 1 2 N 7/00		4 B 0 6 5	
C 1 2 M 1/34 (2006. 01)		C 1 2 M 1/34 F			
GO 1 N 33/53 (2006. 01)		GO 1 N 33/53 M			
審査請求		有 予備審査請求 未請求		(全 44 頁) 最終頁に続く	
出願番号 特願2015-540381 (P2015-540381)		(71) 出願人 503100821			
(21) 国際出願番号 PCT/JP2014/070396		株式会社ビークル			
(22) 国際出願日 平成26年8月1日 (2014. 8. 1)		京都府京都市山科区上山坂尻2 5 - 1 O			
(11) 特許番号 特許第5867890号 (P5867890)		(74) 代理人 110000796			
(45) 特許公報発行日 平成28年2月24日 (2016. 2. 24)		特許業務法人三枝国際特許事務所			
		(72) 発明者 郷 保正			
		京都府京都市山科区上山坂尻2 5 - 1 O			
		株式会社ビークル内			
		(72) 発明者 織田 康則			
		京都府京都市山科区上山坂尻2 5 - 1 O			
		株式会社ビークル内			
		F ターム (参考) 4B024 AA14 BA33 CA06 DA12 EA04			
		GA11 HA15			
		4B029 AA07 BB13 CC01 FA11 GB09			
		最終頁に続く			
(54) 【発明の名称】 免疫学的測定法に用いられるウイルス様粒子、それに用いられるブロッキング剤、及びこれらを含むキット					