

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6663605号
(P6663605)

(45) 発行日 令和2年3月13日(2020.3.13)

(24) 登録日 令和2年2月19日(2020.2.19)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/532 (2006.01) GO 1 N 33/532 Z N A B
GO 1 N 33/535 (2006.01) GO 1 N 33/535
C 1 2 Q 1/66 (2006.01) C 1 2 Q 1/66

請求項の数 9 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2015-186581 (P2015-186581)	(73) 特許権者	504139662 国立大学法人名古屋大学
(22) 出願日	平成27年9月24日 (2015. 9. 24)		愛知県名古屋市千種区不老町 1 番
(65) 公開番号	特開2017-62145 (P2017-62145A)	(74) 代理人	100167689 弁理士 松本 征二
(43) 公開日	平成29年3月30日 (2017. 3. 30)	(72) 発明者	中野 秀雄 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大 学法人名古屋大学内
審査請求日	平成30年9月20日 (2018. 9. 20)	(72) 発明者	森 昭博 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大 学法人名古屋大学内
		(72) 発明者	淵 真悟 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大 学法人名古屋大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫測定用キット及び免疫測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

発光することができる標識成分で標識した抗体、
 前記標識成分が発する波長域の光を吸収する化合物、および、
 標識成分が発する波長域の光を、近赤外波長領域の光に変換する材料で形成された変換部を含む容器、又は前記材料で形成された近赤外蛍光ガラス体を少なくとも含む免疫測定用キット。

【請求項 2】

前記発光することができる標識成分が酵素である請求項 1 に記載の免疫測定用キット。

【請求項 3】

前記酵素がルシフェラーゼである請求項 2 に記載の免疫測定用キット。

【請求項 4】

前記光を吸収する化合物がブルーデキストランである請求項 1 ~ 3 の何れか一項に記載の免疫測定用キット。

【請求項 5】

検体中の測定対象物質と特異的に結合する抗体を固定した容器又はビーズを含む請求項 1 ~ 4 の何れか一項に記載の免疫測定用キット。

【請求項 6】

検体中の測定対象物質の有無を検出、又は測定対象物質を定量する免疫測定方法であって、

検体、前記検体中の測定対象物質と特異的に結合し且つ発光することができる標識成分で標識した抗体、及び前記標識成分から発する波長域の光を吸収する化合物、を媒体中で混合する工程、

前記標識成分から発した光を測定する工程、

測定した光量から、検体中の測定対象物質の有無を検出、又は測定対象物質を定量する工程、

を少なくとも含み、

前記標識成分から発した光を測定する工程が、

標識成分が発する波長域の光を、近赤外波長領域の光に変換する材料で形成された変換部を含む容器、又は前記材料で形成された近赤外蛍光ガラス体を通じた光を測定する

10

免疫測定方法。

【請求項 7】

前記混合する工程が、検体中の測定対象物質と特異的に結合する抗体を固定した容器で行われる請求項 6 に記載の免疫測定方法。

【請求項 8】

前記混合する工程が、媒体中に検体中の測定対象物質と特異的に結合する抗体を固定したビーズを更に含む請求項 6 に記載の免疫測定方法。

【請求項 9】

前記混合する工程の後に、遠心分離を行う工程を含む請求項 6 ~ 8 の何れか一項に記載の免疫測定方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫測定用キット及び免疫測定方法に関し、特に、洗浄工程を不要とすることで、短時間で検体中の測定対象物質の有無を検出又は測定対象物質を定量することができる免疫測定用キット及び免疫測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

農畜産物、食品、食品添加物、飲料、医薬品、医薬部外品、化粧品などの製品または原料における菌学的安全性は、常に保証されている必要がある。そのため、製品または原料中の菌学的分析手法を利用した菌検査・定量が日常的に行われている。また、人間や動物等の健康状態を調べるために、血液及び尿等の体液や細胞等の生体組織（以下、「生体サンプル」と記載することがある。）に含まれる種々のアレルギー物質、ウイルス、タンパク質等の検査・定量も日常的に行われている。

30

【0003】

製品または原料に含まれる菌検査・定量、生体サンプルの検査・定量方法としては、例えば、ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)、イムノクロマト法等の抗原-抗体反応を利用した物質の検査・定量方法が知られている。

40

【0004】

ELISAとは、以下の手順により、検体中の測定対象物質の有無を検出、又は測定対象物質を定量する方法である（非特許文献 1 参照）。

(1) マイクロプレート上に固定した 1 次抗体に抗原を結合させる。

(2) 緩衝液を加えて洗浄した後、酵素等により修飾されている 2 次抗体を抗原に結合させる。

(3) 非結合の 2 次抗体を緩衝液で洗浄・除去後、基質を加えることで 2 次抗体の酵素により発色する。

【0005】

50

また、イムノクロマト法とは、以下の手順により、検体中の測定対象物質の有無を検出、又は測定対象物質を定量する方法である（非特許文献2参照）。

(1) メンブラン上に滴下された検体中の測定対象物質が、金属コロイド等で標識された抗体と複合体を形成し、毛細管現象によってメンブラン上を移動する。

(2) 測定対象物質が存在する時は、検出抗体によって複合体の移動が途中でトラップされ、その呈色を目視によって判断する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】 Johnson et al. Appl. Environ. Microbiol. 1995 61(1) 386-388 10

【非特許文献2】 Won-Bo et al. J. Microbiol. Biotechnol. 2007 17(10) 1629-1637

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかしながら、ELISAは、非結合の抗原や2次抗体を洗浄・除去する工程が必要であり、人手や時間がかかるという問題がある。一方、イムノクロマト法は、ELISAと比較して短時間で検出が可能であるが、感度が低く、夾雑物に弱いという問題がある。

【0008】

20

本発明は、上記問題点を解決するためになされたもので、鋭意研究を行ったところ、(1) 発光することができる標識成分で標識した抗体(2次抗体)から発する波長域の光を吸収する化合物を抗原-抗体反応を行う媒体中に添加すると、(2) 検体中に測定対象物質が含まれない場合は、媒体中に分散している2次抗体からの発光が化合物に吸収されることで、検出機による発光の検出が抑えられること、(3) 一方、検体中に測定対象物質が含まれる場合は抗原-抗体反応により測定対象物質及び2次抗体が複合体を形成し、該複合体を容器の一部に偏在させることで、検体中に測定対象物質が含まれない場合と比較して、検出機による光の検出量を多くできること、(4) そして、媒体中に分散している2次抗体からの発光は化合物に吸収されることから、2次抗体を洗浄・除去する工程が無くとも検体中の測定対象物質の有無を検出、又は測定対象物質を定量できることから、測定対象物質の検出・定量時間を短縮できること、を新たに見出した。

30

【0009】

すなわち、本発明の目的は、短時間で検体中の測定対象物質を検出・定量するための免疫測定用キット及び免疫測定方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は以下に示す免疫測定用キット及び免疫測定方法に関する。

【0011】

(1) 発光することができる標識成分で標識した抗体、及び、

前記標識成分が発する波長域の光を吸収する化合物、
を少なくとも含む免疫測定用キット。

40

(2) 前記発光することができる標識成分が酵素である上記(1)に記載の免疫測定用キット。

(3) 前記酵素がルシフェラーゼである上記(2)に記載の免疫測定用キット。

(4) 前記光を吸収する化合物がブルーデキストランである上記(1)~(3)の何れか一に記載の免疫測定用キット。

(5) 検体中の測定対象物質と特異的に結合する抗体を固定した容器又はビーズを含む上記(1)~(4)の何れか一に記載の免疫測定用キット。

(6) 標識成分が発する波長域の光を、近赤外波長領域の光に変換する材料で形成された変換部を含む容器、又は前記材料で形成された近赤外蛍光ガラス体を含む上記(1)~(

50

4) の何れか一に記載の免疫測定用キット。

(7) 検体中の測定対象物質の有無を検出、又は測定対象物質を定量する免疫測定方法であって、

検体、前記検体中の測定対象物質と特異的に結合し且つ発光することができる標識成分で標識した抗体、及び前記標識成分から発する波長域の光を吸収する化合物、を媒体中で混合する工程、

前記標識成分から発した光を測定する工程、

測定した光量から、検体中の測定対象物質の有無を検出、又は測定対象物質を定量する工程、

を少なくとも含む免疫測定方法。

10

(8) 前記混合する工程が、検体中の測定対象物質と特異的に結合する抗体を固定した容器で行われる上記(7)に記載の免疫測定方法。

(9) 前記混合する工程が、媒体中に検体中の測定対象物質と特異的に結合する抗体を固定したビーズを更に含む上記(7)に記載の免疫測定方法。

(10) 前記混合する工程の後に、遠心分離を行う工程を含む上記(7)~(9)の何れか一に記載の免疫測定方法。

【発明の効果】

【0012】

本発明の免疫測定用キット及び免疫測定方法を用いると、2次抗体の洗浄・除去が不要であることから、操作が簡単で且つ短時間で検体中の測定対象物質を検出・定量することができる。したがって、食中毒菌等に汚染された食品等を早期に発見することが可能となる。また、生体サンプルに含まれる種々のタンパク質等の検査・定量も迅速に行うことができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、本発明の免疫測定の原理を説明する図で、図(1)は検体中に検出対象物質が含まれる場合、図1(2)は検体中に測定対象物質が含まれない場合の例を示している。

【図2】図2は、実施例1及び比較例1の測定結果を表すグラフである。

【図3】図3は、比較例2において、SAビーズ及びCAビーズを用いた場合の測定結果を表すグラフである。

30

【図4】図4(1)はブルーデキストランの吸収波長域を表し、図4(2)はタートラジンの吸収波長域を表す。

【図5】図5はオレンジ色Luc及び緑色Lucの発光波長域を表す図である。

【図6】図6は、実施例2及び比較例3の測定結果を表すグラフである。

【図7】図7は、図面代用写真で、図7(1)は実施例3で作製した台形状の蛍光ガラス、図7(2)は実施例3で作製した容器の写真である。

【図8】図8は、実施例3及び比較例4の測定結果を表すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0014】

40

以下に、本発明の免疫測定用キット及び免疫測定方法について詳しく説明する。図1は、本発明の免疫測定の原理を説明する図である。図1(1)は検体中に検出対象物質が含まれる場合の例を示している。本発明の免疫測定用キットは、少なくとも、発光することができる標識成分1で標識した抗体(2次抗体)2、標識成分1が発する波長域の光を吸収する化合物3を含んでいる。検体中に測定対象物質4が含まれていると、容器5の一部に固定されている測定対象物質4を特異的に認識する抗体(1次抗体)6に測定対象物質4が結合し、更に測定対象物質4に2次抗体2が結合して複合体を形成する。そして、複合体が容器5の壁面に偏在することから2次抗体2が発する光も容器壁面に偏在し、検出機7により2次抗体2が発する光を検出し易くなる。以下、本発明の免疫測定方法を「生物発光色素吸収法」と記載することがある。

50

【0015】

一方、図1(2)は検体中に測定対象物質4が含まれない場合の例を示している。測定対象物質4が含まれない場合は、2次抗体2は、測定対象物質4と複合体を形成しないことから、化合物3を含む媒体中に分散した状態となる。2次抗体2が発する光は化合物3に吸収されるので、図1(1)と比較して検出機7により検出され難くなる。

【0016】

本発明の生物発光色素吸収法では、2次抗体2が発する光を化合物3で吸収することが特徴である。そのため、測定対象物質4と2次抗体2が複合体を形成した場合でも、当該複合体が溶媒中に分散した状態であると2次抗体2が発する光を化合物3が吸収してしまい、検出感が悪くなる。そのため、測定対象物質4と2次抗体2の複合体が可能な限り容器5の壁面に偏在し、2次抗体2が発する光が化合物3に吸収され難くすることが好ましい。図1(1)に示す例では、容器5の壁面の一部(底面)に1次抗体6を固定することで複合体を容器5の底面付近に偏在させているが、複合体を容器5の壁面の特定部分に偏在できれば、特に制限は無い。

10

【0017】

例えば、測定対象物質4が菌体等の媒体に不溶性の物質の場合、容器5として遠心分離機に装着可能な容器を用い、菌体と2次抗体2を結合させて複合体を形成した後、遠心分離により複合体を容器5の底部に偏在させてもよい。その場合、1次抗体6を容器5に固定しなくてもよい。また、1次抗体6を容器5ではなく磁性ビーズ等に固定することで、1次抗体6-測定対象物質4-2次抗体2の複合体を、磁力等を用いて容器5の壁面に引き寄せることで偏在してもよい。更に、1次抗体6をガラスビーズ等の固体物質に固定して、1次抗体6-測定対象物質4-2次抗体2の複合体を、遠心分離機を用いて容器5の底部に偏在してもよい。

20

【0018】

標識成分1は、2次抗体2に結合することができ、発光できる成分であれば特に制限は無い。例えば、ルシフェラーゼ(以下、「Luc」と記載することがある。)、ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ(CAT)、アルカリフォスファターゼ(AP)、グルクロニダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)等の基質と反応することで発光する酵素; 緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescent Protein, GFP)、phycoerythrin(PE)、allophycocyanin(APC)等の基質が無くても発光する蛍光タンパク質; フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ローダミン、テキサスレッド、Cy3、Cy5等の蛍光色素; 量子ドット(Quantum Dot: QD)と呼ばれる半導体結晶; 等が挙げられる。

30

【0019】

標識成分1として酵素を用いる場合、当該酵素に特異的な公知の基質を用いて発光すればよい。例えば、ホタルルシフェラーゼであれば甲虫ルシフェリン、ウミシイタケルシフェラーゼであればセレンテラジン、ガラクトシダーゼであれば1,2-dioxetane類、HRPであればルミノール系基質等、公知の酵素と基質の組み合わせを用いればよい。

40

【0020】

2次抗体2は、測定対象物質4を特異的に認識できるものであれば特に制限は無い。例えば、市販されている抗体、又は、測定対象物質4を用いた公知の抗体製造方法により製造した抗体を用いればよい。標識成分1で標識した抗体(2次抗体)2は、標識成分1と抗体2が結合できれば特に制限はなく、公知の方法で結合すればよい。例えば、標識成分1をビオチン化し、2次抗体2をストレプトアビジン化し、ビオチン-ストレプトアビジン結合により両者を結合すればよい。ビオチン化、ストレプトアビジン化は、市販されている公知のキットを用いて行えばよい。

【0021】

本発明の化合物3は、標識成分1が発する光の波長域を吸収できるものであれば特に制

50

限は無い。化合物3が吸収できる光の波長域が、標識成分1が発する光の波長域と少なくとも一部が重複していることが好ましく、標識成分1が発する光のピーク波長を含んでいることがより好ましく、標識成分1が発する光の波長域を全て含んでいることが特に好ましい。

【0022】

化合物3の具体例としては、ブルーデキストラン、ブロムフェノールブルー、アントシアニン等が挙げられる。例えば、ルシフェラーゼは生物種により異なるものの、ホタルルシフェラーゼは約556nm、ウミシイタケルシフェラーゼは約480nmがピーク波長を有するので、化合物3としては、ルシフェラーゼの上記波長域の光を収めるブルーデキストランを選択すればよい。なお、化合物3は単独で用いることもできるが、標識成分1が発する光の波長域を単独の化合物3で吸収できない場合は、異なる吸収波長域を持つ化合物3を組み合わせて用いてもよい。

10

【0023】

化合物3の濃度は、媒体中に遊離した2次抗体2が発する光を吸収し、検出機7に届き難くするために必要な量であればよい。媒体中の標識成分1の濃度にもよるが、例えば、ABSに換算して2以上が好ましく、2.5以上がより好ましく、3以上が特に好ましい。化合物3の濃度が薄すぎると、媒体中に遊離している2次抗体2が発する光が検出機に届くので好ましくない。一方、化合物3の濃度の上限は特になく、媒体中に溶解可能な範囲とすればよい。

【0024】

本発明の生物発光色素吸収法により測定できる測定対象物質4としては、測定対象物質4を抗原として、抗原抗体反応できるものであれば特に制限は無い。例えば、食品等に含まれる菌を検出する場合、細菌、真菌及び放線菌等が挙げられる。

20

【0025】

細菌としては、グラム陽性細菌やグラム陰性細菌がある。グラム陽性細菌としては、腸球菌、連鎖球菌、ブドウ球菌、バチルス属、バエニバチルス属、乳酸桿菌属、リステリア属、ペプトストレプトコッカス属、プロピオン酸菌属、クロストリジウム属、バクテロイデス属、ガードネラ属、コクリア属、ラクトコッカス属、ロイコノストック属、マイクロコッカス、マイコバクテリウム属、コリネバクテリウム属などに属する細菌等が挙げられる。グラム陰性細菌としては、シュドモナス属、エシェリキア属、サルモネラ属、赤痢菌属、エンテロバクター属、クレブシエラ属、セラチア属、プロテウス属、カンピロバクター属、ヘモフィルス属、モルガネラ属、ビブリオ属、エルシニア属、アシネトバクター属、ステノトロフォモナス属、プレブンディモナス属、ラルストニア属、アクロモバクター属、フゾバクテリウム属、プレボテラ属、ブランハメラ亜属、ナイセリア属、バークホルデルリア属、シトロバクター属、ハフニア属、エドワードシエラ属、アエロモナス属、モラクセラ属、ブルセラ属、パストツレラ属、プロビデンシア属、レジオネラ属などに属する細菌等が挙げられる。

30

【0026】

真菌としては、酵母、カビ(糸状菌)、キノコを挙げることができ、具体的には、カンジダ属、クリプトコックス属、ノカルジア属、アオカビ属、アルタナリア属、ロドトルラ属、アスペルギルス属、フザリウム属、サッカロミセス属、トリコスポロン属などに属する菌が挙げられる。放線菌の例としては、ストレプトマイセス属、フランキア属、マイコバクテリウム属、コリネバクテリウム属、アクチノマイセズ属などに属する菌が挙げられる。

40

【0027】

本発明の方法では、ELISA等の従来の測定方法と比較して簡単且つ短時間で測定することが可能であることから、特定の病原性細菌を検出する際に特に有用である。病原性細菌の具体例としては、サルモネラ菌、リステリア菌、病原性大腸菌、O157等に代表される腸管出血性大腸菌、腸炎ビブリオ、チフス菌、パラチフス菌、コレラ菌、赤痢菌、セレウス菌、カンピロバクター菌、ボツリヌス菌、黄色ブドウ球菌などが挙げられる。

50

【0028】

上記の測定対象物質4を含む検体としては、農畜産物、食品、食品添加物、飲料、医薬品、医薬部外品、化粧品、水（例えば飲料水、非飲料水及び廃水）、海水バラスト、空気、土壌、汚水、血液製剤（例えば血小板、血清、血漿、白血球分画等）等が挙げられる。

【0029】

また、生体サンプルを検体とした場合の測定対象物質4としては、花粉、ダニ等のアレルギー物質；HIV、肝炎等のウイルス；PSA等の癌マーカー；各種タンパク質；等が挙げられる。

【0030】

検体、2次抗体2、化合物3を混合するための媒体としては、従来から免疫測定で用いられている媒体であれば特に制限は無く、例えば、リン酸バッファー等が挙げられる。

10

【0031】

容器5は、免疫測定に使用できる容器であれば特に制限は無いが、本発明では容器5を通過する光を検出する。そのため、検出感度を上げるためには標識成分1が発する光の透過性が高い透明な材料で容器を作製することが好ましい。測定対象物質4を捕捉する為の1次抗体6を容器5に固定しない場合は、エペンドルフチューブ等、遠心分離機に装着し遠心分離できる容器が好ましい。一方、1次抗体6を用いる場合は、容器5は特に制限は無く、96ウェルプレート等、免疫測定分野で使用されている一般的な容器を用いればよい。

【0032】

なお、本発明では、標識成分1が発する光をそのまま検出機7で検出してもよいが、標識成分1から発する光の波長域を近赤外波長領域、例えば、850～1700nm程度に変換部で変換し、当該波長域を検出できる検出機7を用いてもよい。変換部を構成する部材としては、例えば、Ybイオン、Ndイオン、Tmイオン、Smイオン、Hoイオン、Erイオン、Dyイオン、Prイオン等の希土類イオンを、硼酸系ガラス、ゲルマン酸系ガラス、リン酸系ガラス、フッ化物ガラス等に添加したガラス等が挙げられる。具体的には、 $\text{Bi}_2\text{O}_3 - \text{B}_2\text{O}_3$ 系ガラス、 $\text{Bi}_2\text{O}_3 - \text{GeO}_2$ 系ガラス、 $\text{ZnO} - \text{B}_2\text{O}_3$ 系ガラス、 $\text{CaO} - \text{B}_2\text{O}_3$ 系ガラス及び $\text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$ 系等の公知のガラスが挙げられる。

20

【0033】

可視光の波長領域を検出する場合と異なり、標識成分1から発する光の波長領域を近赤外波長領域に変換する場合、容器5は透明である必要はない。したがって、容器5は不透明な材料で形成してもよく、容器5を作製する材料の選択範囲を広くすることができる。光の波長領域を変える場合は、上記成分で作製した近赤外蛍光ガラス体に1次抗体6を固定して、媒体中に添加すればよい。近赤外蛍光ガラス体は1次抗体6 - 測定対象物質4 - 2次抗体2と複合体を形成することから、標識成分1が発する光を近赤外蛍光ガラス体で近赤外波長領域に変換することができ、容器5を通過した近赤外波長領域の光を検出機で検出すればよい。

30

【0034】

近赤外蛍光ガラス体を用いた場合は、容器5全体を不透明な材料で作製することができるが、容器5の一部に上記成分で作製した変換部（近赤外蛍光ガラス体）を組み込んでもよい。変換部に1次抗体6を固定しておくことで、変換部及び/又は変換部周辺の容器5を通して、近赤外波長領域の光を検出機7で検出することができる。

40

【0035】

1次抗体6は、2次抗体2と同様、測定対象物質4を特異的に認識して結合できるものであれば特に制限は無く、市販されている抗体、又は、測定対象物質4を用いた公知の抗体製造方法により製造した抗体を用いればよい。なお、上記のとおり1次抗体6を用いることは必須ではないが、用いる場合は、容器5の壁面に公知の方法で固定すればよい。また、容器5に変え、免疫測定分野で従来より使用されている磁性ビーズ、ガラスビーズ等に固定してもよい。

【0036】

50

検出機 7 は、標識成分 1 から発する光が可視光の場合は可視光領域の波長に感度がある検出機であれば特に制限は無く、例えば、Si 系の CCD、CMOS カメラ等が挙げられる。また、近赤外光領域に変換して検出する場合には、例えば、850 ~ 1700 nm 程度の波長に感度があり、且つ 850 nm 以下の波長には感度がないものが好ましく、例えば、InGaAs カメラ、ゲルマニウムカメラ、ビジコンカメラ等が挙げられる。また、検出機 7 には、標識成分 1 が発する波長域以外の波長域の光を除去するためのフィルターを設けることで周囲のノイズを除去し、検出感度を高めてもよい。

【0037】

本発明の免疫測定方法は、必要に応じて 1 次抗体を固定した容器 5 に、検体、標識成分 1 で標識した 2 次抗体 2、標識成分 1 が発する光の波長域の光を吸収する化合物 3 を媒体中で混合する工程、標識成分 1 から発光した光を検出機 7 で測定する工程を少なくとも含んでいる。なお、標識成分 1 が酵素の場合は、当該酵素に特異的な基質を媒体中に添加しておけばよい。また、1 次抗体 6 を容器 5 に固定した場合、又は、1 次抗体 6 を固定したビーズを容器 5 に入れる場合は、遠心分離工程は必要に応じて実施すればよいが、1 次抗体 6 を用いない場合は、測定する工程の前に、遠心分離をする工程を設けることが好ましい。

10

【0038】

以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、この実施例は単に本発明の説明のため、その具体的な態様の参考のために提供されているものである。これらの例示は本発明の特定の具体的な態様を説明するためのものであるが、本願で開示する発明の範囲を限定したり、あるいは制限することを表すものではない。

20

【実施例】

【0039】

<ルシフェラーゼ (Luc) の作製>

本発明の実施例で用いるオレンジ色 Luc と緑色 Luc を以下の手順で作製した。

1. オレンジ色 Luc

(1) 発現に用いる Luc の DNA 配列の決定

NCBI のデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/E05447.1>) から、Luc のアミノ酸配列を取得し、以下の 2 つの変異を加えた配列を設計した。

30

・217 番目: Thr Ile

なお、当該変異は耐熱性向上が目的である (“Kajiyama et al., “Thermostabilization of Firefly Luciferase by a Single Amino Acid Substitution at Position 217”, *Biochemistry* 1993, 32, 13795-13799、参照)。

・257 番目: Tyr Arg

なお、当該変異は Luc の色を、緑からオレンジ色に変えるのが目的である (Yu Wang et al., “Impact of Site-Directed Mutant Luciferase on Quantitative Green and Orange/Red Emission Intensities in Firefly Bioluminescence”, *SCIENTIFIC REPORT*, 2013、参照)。

40

次に、決定したアミノ酸配列を Optimizer (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>) よって、大腸菌に発現させるのに最適な DNA 配列に変換した。

次に、5' 末端側に His tag 及び制限酵素 Nde I の認識配列、3' 末端に Xba I の認識配列を付加した。

【0040】

(2) DNA 配列の合成

50

I D T社のDNA合成サービス (http://ruo.mbl.co.jp/customom/custom_gene.html)により、上記(1)で配列決定したDNAの合成を行った。

【0041】

(3) オレンジ色Luc遺伝子の発現ベクターへのクローニング

制限酵素Nde I及びXba I (いずれもTakara bio社製)により、LucのDNA配列及び低温発現ベクターpCold I (Takara bio社製)を処理した。次に、Takara DNA ligation kit ver2を用いて、2つのDNA断片を結合し、大腸菌DH5 (Toyobo社製 DNA-901)に形質転換後、発生したコロニーを培養してプラスミドを抽出した。次に、シーケンス解析により狙い通り発現ベクターにLucの遺伝子が導入されているのを確認した。

10

【0042】

(4) オレンジ色Lucの発現、精製

大腸菌BL21 (DE3) (Novagen社製 (現メルクミリポア社製)、69450-3CN)に、上記(3)で配列を確認したプラスミドを導入した。次に、セルを200mLのLB培地中、37で対数増殖期まで培養し、16で30min静置後、終濃度1MになるようにIPTG (Wako製)を加えた。更に、24時間培養後、Ni-NTA-Agarose (Qiagen社製)を使って、His tag精製を行った。各画分をSDS-PAGEにより解析し、Lucが含まれる画分を回収した。次に、PBS (pH7.4)で透析することで、オレンジ色Lucを得た。

20

【0043】

2. 緑色Luc

(1) 緑色Lucの配列の作製

上記「1. オレンジ色Luc」に記載の(3)で合成したDNAをQuick change法を用いて、257番目のArgをTyrに変換した。

【0044】

(2) 緑色Lucの作製

以下の2つのPCRプライマーを用いて、pCold orange Lucを鋳型として、257番目のArgがTyrに変換したプラスミドを合成した。増幅は、Pfu turbo (アジレントテクノロジー社製)を用い、以下の条件で実施した。

30

・257th R Luc Y for QC F:

GGCATGTTTCACCACTCTGGGTTATCTGATCTGCGGCTTCC
(配列番号1)

・257th R Luc Y for QC R:

GGAAGCCGCGAGATCAGATAACCCAGAGTGGTGAACATGCC
(配列番号2)

増幅条件: 95で2分 (95で10秒 55で15秒 72で6分) × 20回 72で20分 16

【0045】

次に、制限酵素Dpn I (Takara bio社製)を加えて鋳型を分解した。そして、大腸菌DH5に形質転換した後は、上記1.(4)と同様の手順で、緑色Lucの発現、精製を行った。

40

【0046】

[モデル系による生物発光色素吸収法の実証]

<実施例1>

ビオチンとストレプトアビジンは自然界で最も強固に結合することが知られており、様々な生物化学の研究において用いられている。この結合を利用して、生物発光色素吸収法のモデル系を構築し、本発明の免疫測定方法の実証を行った。

上記の手順で作製した緑色Lucを、同人化学研究所製Biotin labeling kit-NH2を用いてビオチン化した。

50

次に、PCRチューブ（BM機器株式会社製 PCR-02F2）に、

- ・ 緑色ビオチン化Lucを10ng、
- ・ ビオチンと結合するストレプトアビジンが固定されたSAビーズ（Life technologies社製、Dynabeads（登録商標）M270 streptavidin）を $6-7 \times 10^6$ beads、
- ・ ブルーデキストラン（GE Health care life science社製 17-0360-01）、
- ・ Lucの基質が含まれている定量試薬（Promega社製、One Glo Luciferase assay system）を100 μ L、

加え、更に、PBS（pH7.4）を加えて合計200 μ Lとすることで反応系を作製した。なお、ブルーデキストランは、反応系中の濃度が1.0wt%となるように添加した。反応系をピペティングによって混合後、磁石上に10秒間静置し、浜松ホトニクス社製H7360-01を用いて30秒間測定した。なお、株式会社島津製作所製紫外可視分光光度計UV2450を用いて混合時の反応系のABSを測定した値は、6.98（トップピーク）であった。

10

【0047】

<比較例1>

実施例1のSAビーズの代わりに、ネガティブコントロールとしてビオチンと結合しないCAビーズ（Life Technologies社製、Dynabeads（登録商標）M270 carboxylic acid）を用いた以外は、実施例1と同様の

20

【0048】

図2は、実施例1及び比較例1の測定結果を表すグラフである。SAビーズを用いた実施例1は、ネガティブコントロールであるCAビーズを用いた比較例1より、有意に高いシグナルを得ることができた。これは、比較例1ではLucの発光がブルーデキストランに吸収されたのに対して、実施例1ではビオチン-ストレプトアビジン相互作用によってビオチン化Lucと結合したビーズが、磁石により容器底部に偏在したため、より多くのルシフェラーゼの発光が検出機により検出されたためと考えられる。

【0049】

[標識成分から発光する波長域と光を吸収する化合物の関係]

30

<比較例2>

実施例1（SAビーズ）のブルーデキストランに代え、ABSのピークが同じとなるようにタートラジン（Wako社製 204-00102）を添加（ 5.54×10^{-3} wt%）した以外は、実施例1と同様の手順で実験を行った。また、比較例1（CAビーズ）についても、上記と同様の手順でタートラジンに変えた実験を行った。

【0050】

図3は、SAビーズ及びCAビーズを用いた場合の測定結果を表すグラフである。化合物として実施例1及び比較例1のブルーデキストランに代え、タートラジンを用いた場合、SAビーズとCAビーズで大きな差は無く、且つ、photon counts/sの値も実施例1及び比較例1より高かった。これは、CAビーズを用いた場合、ビオチン化Lucは遊離しているものの、タートラジンでほとんど吸収されなかった為と考えられる。なお、SAビーズを用いたものの方が若干高い値が得られたが、これはSAビーズと結合したビオチン化Lucが容器底部に集まっていることに起因するものと考えられる。

40

【0051】

次に、Lucの発光波長域と、光を吸収する化合物であるブルーデキストラン及びタートラジンの吸収波長域の関係を調べる実験を行った。

【0052】

<光を吸収する化合物の吸収波長域の測定>

ブルーデキストラン（PBSで濃度を0.1wt%となるように調整）及びタートラジン（PBSで濃度を 0.1×10^{-2} wt%となるように調整）の吸収波長域を、株式会社

50

島津製作所製紫外可視分光光度計UV2450を用いて測定した。図4(1)はブルーデキストランの吸収波長域を表し、図4(2)はタートラジンの吸収波長域を表す。ブルーデキストランの吸収波長域は約450~750nmで吸収のピークは617nm、タートラジンの吸収波長域は約300~500nmで吸収のピークは426nmであった。

【0053】

<Lucの発光波長域の測定>

オレンジ色Lucを含むPBSバッファー(pH7.4)100 μ L(Luc濃度:10 μ g/mL)及びOne Glo Luciferase assay system 100 μ Lを混合し、日本分光株式会社製Spectrofluorometer FP-8500を用いて発光波長域の測定を行った。緑色Lucについても同様の手順で測定を行った。

10

【0054】

図5はオレンジ色Luc及び緑色Lucの発光波長域を表す図である。オレンジ色Lucの発光波長域は約500~650nmで発光のピークは約575nm、緑色Lucの発光波長域は約480~630nmで発光のピークは約545nmであった。上記の測定結果より、実施例1及び比較例1において、緑色Lucの発光波長域(約480~630nm)はブルーデキストランの吸収波長域(約450~750nm)に含まれていた。一方、比較例2において、緑色Lucの発光波長域(約480~630nm)は、タートラジンの吸収波長域(約300~500nm)とはほぼ異なっていた。以上の結果より、本発明の生物発光色素吸収法では、抗原-抗体反応する媒体中に加える化合物が吸収する光の波長領域が、標識成分1が発する光の波長域と少なくとも一部が重複、より好ましくは標識成分1が発する光の波長域を含むと、反応しなかった2次抗体2の標識成分1から発する光を効率的に吸収できることが明らかとなった。

20

【0055】

[生物発光色素吸収法による菌の検出]

上記実施例1により、本発明の生物発光色素吸収法の有用性が確認できたことから、大腸菌を用いた検出を行った。

【0056】

<実施例2>

1 μ g/mLの緑色ピオチン化Lucを20 μ L、ストレプトアビジン化anti O157抗体を5 μ L、 4×10^5 cells(1 OD600/mL = 8×10^8 で換算)を含む菌液5 μ L、を1.5mLエッペンドルフチューブに加えてピペティングにより混合し、30minローテーターで混合した。緑色ピオチン化Lucとストレプトアビジン化anti O157抗体は、ピオチン-ストレプトアビジンの相互作用によって結合し、抗体-Luc複合体となる。ストレプトアビジン化anti O157抗体は、KPL社製Affinity Purified Antibody To E.coli O157:H7 Bac Trace Antibodyを、Abcam社製Streptavidin conjugation kitによってストレプトアビジン化することで作製した。続いて、One Glo Luciferase assay system 40 μ L、ブルーデキストラン、更にPBSを加え、合計200 μ Lの反応系を作製した。なお、反応系中のブルーデキストランの濃度は1.625wt%となるように添加した。ピペティングにより混合し、遠心分離機により20,817 \times gでFlashing後、浜松ホトニクス社製H7360-01を用いて30秒間測定した。

30

40

【0057】

<比較例3>

菌体を加えなかった以外は、実施例2と同様の手順で実験を行った。

【0058】

図6は、実施例2及び比較例3の測定結果を表すグラフである。菌を添加しなかった比較例3では、シグナルが464 counts/sだったのに対し、菌を添加した実施例2では、2189 counts/sのシグナルを検出することができた。以上の結果から、

50

本発明の生物発光色素吸収法を用いることで、従来のELISAと異なり、結合しなかった抗原、抗体等の洗浄工程を要せず、簡単且つ短時間で検体中の測定対象物質を測定できることを確認した。

【0059】

次に、生物発光色素吸収法の実施形態として、ルシフェラーゼの光を蛍光ガラスによって他の波長に変換した上で計測できるか確認を行った。

<実施例3>

蛍光ガラスを組み込んだ容器に、400 µg/mLの緑色ビオチン化Lucを1 µL、実施例2で作製したストレプトアビジン化anti O157抗体を5 µL、 8×10^5 cells ($1 \text{ OD}600/\text{mL} = 8 \times 10^8$ で換算)を含む菌液を10 µL、加えてピペティングにより攪拌し、30 minローターで混合した。続いて、One Glo Luciferase assay system 36 µL、ブルーデキストラン、更にPBSを加え、合計200 µLの反応系を作製した、なお、反応系中のブルーデキストランの濃度1.8 wt%となるように添加した。ピペティングにより混合し、3,000 × gで5 min遠心分離し、浜松ホトニクス社製近赤外光電子増倍管H10330B-45を用いて30秒間測定した。

【0060】

なお、蛍光ガラスを組み込んだ容器は、次の手順で作製した。(1) 先ず、49.5 mol% Bi₂O₃粉末(関東化学社製 素材研究用試薬)、B₂O₃換算で49.5 mol%となる量のH₃BO₃粉末(ナカライテスク社製 特級試薬)、1 mol% Sb₂O₃粉末(和光純薬工業株式会社製 試薬)を母体としたガラス原料、並びに、3 mol% Yb₂O₃粉末(関東化学社製 素材研究用試薬)及び1 mol% Nd₂O₃粉末(関東化学社製 素材研究用試薬)をチャック袋の中で混合し、蛍光ガラスの原料である混合粉末を調整した。次いで、混合粉末をアルミナ坩堝に投入し、大気雰囲気化、1250 で10分間加熱をして、溶融させた。続いて、ステンレス鑄型に溶融物(融液)を流し出して、室温(約20)で空冷させて、台形状の蛍光ガラス(変換部)を作製した。図7(1)は作製した蛍光ガラスの写真である。

次に、3Dプリンター(Stratasys OBJET 30 Pro)を使用し、樹脂としてOBJET Velo clear RGD810(Stratasys社製)を用いて、図7(2)に示す形状の容器を作製した。容器の筒状部分の内径(L)は6 mm、筒状部分の高さ(H)は11 mmであった。次いで、作製した容器の底面の内径部分に、図7(1)に示す台形状のガラス組成物を嵌めこんだ。

【0061】

<比較例4>

菌体を加えなかった以外は、実施例3と同様の手順で実験を行った。

【0062】

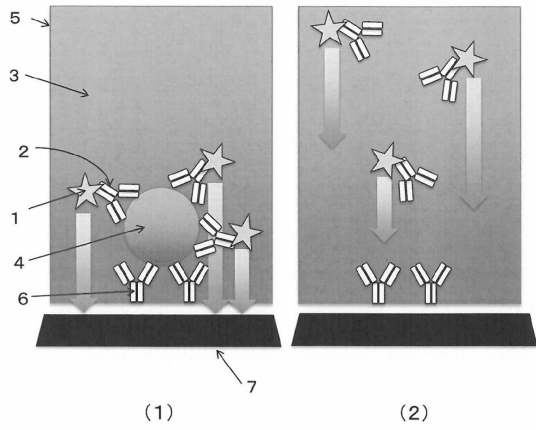
図8は、実施例3及び比較例4の測定結果を表すグラフである。菌を添加しなかった比較例4では、シグナルが60 counts/sであったのに対し、菌を添加した実施例3では、253 counts/sのシグナルを検出することができ、有意な差が見られた。以上の結果から、本発明の生物発光色素吸収法は、標識成分1からの発光を直接検出するのみでなく、標識成分1が発する光を他の波長域に変換して測定できることを確認した。

【産業上の利用可能性】

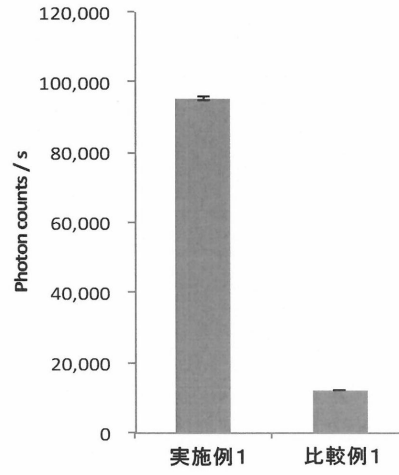
【0063】

本発明の免疫測定用キット及び免疫測定方法を用いると、簡単且つ短時間で検体中の測定対象物質を検出・測定することができる。したがって、食中毒菌等に汚染された食品等の検査、医療機関等での検査・定量に有用である。

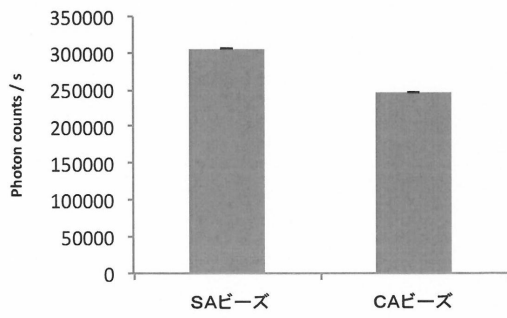
【図1】



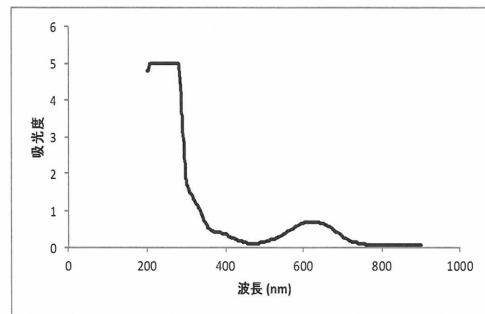
【図2】



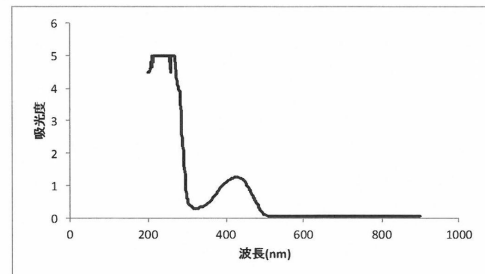
【図3】



【図4】

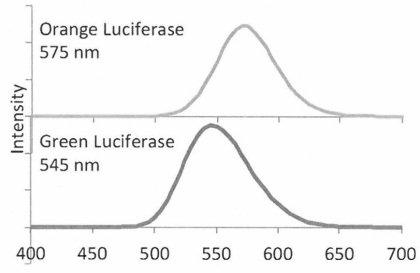


(1)

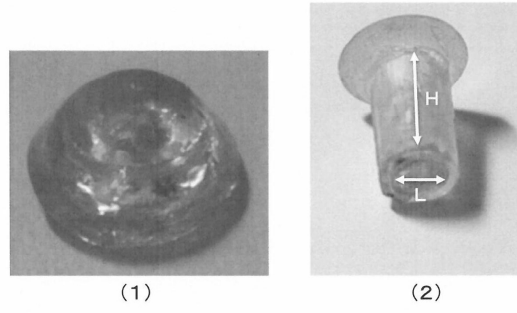


(2)

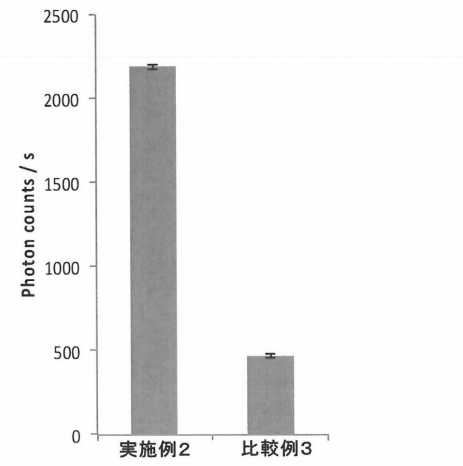
【 図 5 】



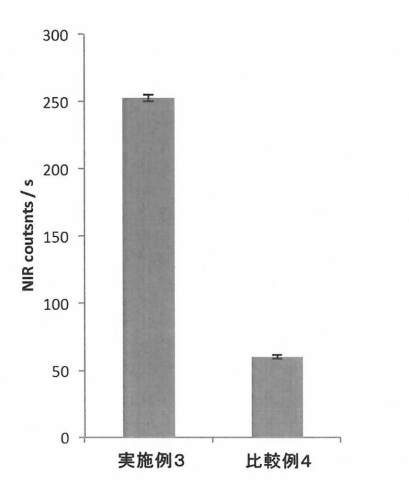
【 図 7 】



【 図 6 】



【 図 8 】



【 配列表 】

[0006663605000001.app](#)

フロントページの続き

(72)発明者 加藤 晃代

愛知県豊田市八草町秋合1267番1 公益財団法人科学技術交流財団内

審査官 高田 亜希

(56)参考文献 米国特許第05017473(US,A)

特表2012-503780(JP,A)

特開2002-034594(JP,A)

国際公開第2010/036827(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

G01N 33/48 - 33/98

C12Q 1/00 - 3/00

G01N 21/75 - 21/83

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	免疫测定试剂盒和免疫测定方法		
公开(公告)号	JP6663605B2	公开(公告)日	2020-03-13
申请号	JP2015186581	申请日	2015-09-24
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人名古屋大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人名古屋大学 公益财团法人科学技术交流财团		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人名古屋大学		
[标]发明人	中野秀雄 森昭博 渊真悟 加藤晃代		
发明人	中野 秀雄 森 昭博 渊 真悟 加藤 晃代		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/535 C12Q1/66		
FI分类号	G01N33/532.ZNA.B G01N33/535 C12Q1/66 G01N33/532.BZN.A		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ79 4B063/QR10 4B063/QR58 4B063/QS33 4B063/QX02		
代理人(译)	松本 征二		
其他公开文献	JP2017062145A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种免疫检测试剂盒和免疫检测试剂盒，可在短时间内检测和定量标本中的测量物质。解决方案：免疫检测试剂盒至少包括：用能够发光的标记成分标记的抗体；以及一种吸收标记组件发出的波长带中的光的化合物。图1

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6663605号 (P6663605)
(45) 発行日 令和2年3月13日 (2020.3.13)	(24) 登録日 令和2年2月19日 (2020.2.19)	
(51) Int. Cl. F I		
G O 1 N 33/532 (2006.01)	G O 1 N 33/532 Z N A B	
G O 1 N 33/535 (2006.01)	G O 1 N 33/535	
C 1 2 Q 1/66 (2006.01)	C 1 2 Q 1/66	
請求項の数 9 (全 15 頁)		
(21) 出願番号 特願2015-186581 (P2015-186581)	(73) 特許権者 504139662 国立大学法人名古屋大学	
(22) 出願日 平成27年9月24日 (2015.9.24)	愛知県名古屋市千種区不老町 1 番	
(65) 公開番号 特開2017-62145 (P2017-62145A)	100167689	
(43) 公開日 平成29年3月30日 (2017.3.30)	(74) 代理人 弁理士 松本 征二	
審査請求日 平成30年9月20日 (2018.9.20)	(72) 発明者 中野 秀雄 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大 学法人名古屋大学内	
	(72) 発明者 森 昭博 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大 学法人名古屋大学内	
	(72) 発明者 渊 真悟 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大 学法人名古屋大学内	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 免疫測定用キット及び免疫測定方法		