

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-49184

(P2017-49184A)

(43) 公開日 平成29年3月9日(2017.3.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/533 (2006.01)	GO 1 N 33/533	2 GO 4 3
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64 Z N A F	4 HO 4 5
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 16/18	

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2015-174075 (P2015-174075)	(71) 出願人	304021417 国立大学法人東京工業大学 東京都目黒区大岡山2丁目12番1号
(22) 出願日	平成27年9月3日(2015.9.3)	(71) 出願人	000102212 ウシオ電機株式会社 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号
		(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
		(72) 発明者	上田 宏 東京都目黒区大岡山2丁目12番1号 国立大学法人東京工業大学内

最終頁に続く

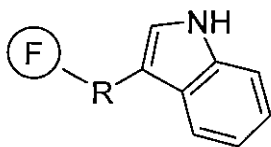
(54) 【発明の名称】 抗体のヌクレオチド結合部位 (NBS) を利用して蛍光標識された抗体

(57) 【要約】

【課題】 抗体の可変領域内部に存在するヌクレオチド結合部位を利用して、光化学修飾法により、抗原の結合により蛍光強度が変化する蛍光標識抗体を作製する方法、及び得られた蛍光標識抗体の提供。

【解決手段】 下記式(1)：

【化1】



(式中、Fは蛍光基であり、Rは、置換又は未置換の、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、C4~C10シクロアルキル基、C4~C10ヘテロシクリル基、C4~C10アリーニル基、C4~C10ヘテロアリーニル基、アリーレン基、エーテル基、エステル基、PEG基、スルフィド基、アミド基、ケトン基、スルファミド基及びそれらの組合せからなる群より選択されるリンカー基である)で表される、インドール酪酸(IBA)と蛍光基が結合している、抗体のヌクレオチド結合部位(NBS)標識用化合物が抗体内のヌクレオチド結合部位にコンジュゲートされている蛍光免疫測定用標識抗体。

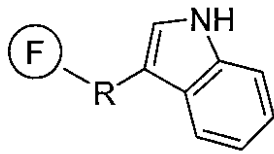
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式(1)：

【化 1】



(1)

(式中、Fは蛍光基であり、Rは、置換又は未置換の、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、C4～C10シクロアルキル基、C4～C10ヘテロシクリル基、C4～C10アリー
ル基、C4～C10ヘテロアリール基、アリーレン基、エーテル基、エステル基、PEG基
、スルフィド基、アミド基、ケトン基、スルファミド基及びそれらの組合せからなる群よ
り選択されるリンカー基である)で表される、インドール酪酸(IBA)と蛍光基が結合し
ている、抗体のヌクレオチド結合部位(NBS)標識用化合物が抗体内のヌクレオチド結合
部位にコンジュゲートされている蛍光免疫測定用標識抗体。

10

【請求項 2】

前記蛍光基が、ローダミン系、クマリン系、オキサジン系、カルボピロニン系、シアニ
ン系、ピロメセン系、ナフタレン系、ピフェニル系、アントラセン系、フェナントレン系
、ピレン系、カルバゾール系、Cy系、EVOblue系及びこれらの誘導体からなる群
より選択される少なくとも1種である、請求項1に記載の蛍光免疫測定用標識抗体。

20

【請求項 3】

前記蛍光基が、テトラメチルローダミン、ローダミン110及びATTO655(登録商標)から
なる群より選択される少なくとも1種を含む、請求項2に記載の蛍光免疫測定用標識抗体

。

【請求項 4】

抗体がscFv型抗体、Fab型抗体及び完全抗体からなる群から選択される、請求項1～3
のいずれか1項に記載の蛍光免疫測定用標識抗体。

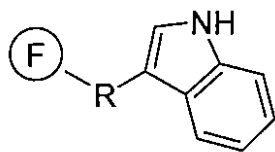
【請求項 5】

蛍光免疫測定用標識抗体の製造方法であって、

下記式(1)：

30

【化 2】



(1)

(式中、Fは蛍光基であり、Rは、置換又は未置換の、アルキル基、アルケニル基、アル
キニル基、C4～C10シクロアルキル基、C4～C10ヘテロシクリル基、C4～C10アリー
ル基、C4～C10ヘテロアリール基、アリーレン基、エーテル基、エステル基、PEG基
、スルフィド基、アミド基、ケトン基、スルファミド基及びそれらの組合せからなる群よ
り選択されるリンカー基である)で表される、インドール酪酸(IBA)と蛍光基が結合し
ている、抗体のヌクレオチド結合部位(NBS)標識用化合物と抗体を含む溶液に、中心波
長254nmの紫外線を照射することにより、前記化合物のインドール基と抗体のヌクレオチ
ド結合部位の間で光架橋反応を生じさせ、前記化合物と抗体をコンジュゲートする工程を
含む、蛍光免疫測定用標識抗体の製造方法。

40

【請求項 6】

前記蛍光基が、ローダミン系、クマリン系、オキサジン系、カルボピロニン系、シアニ
ン系、ピロメセン系、ナフタレン系、ピフェニル系、アントラセン系、フェナントレン系
、ピレン系、カルバゾール系、Cy系、EVOblue系及びこれらの誘導体からなる群

50

より選択される少なくとも1種である、請求項5に記載の製造方法。

【請求項7】

前記蛍光基が、テトラメチルローダミン、ローダミン110及びATTO655（登録商標）からなる群より選択される少なくとも1種を含む、請求項6に記載の製造方法。

【請求項8】

抗体がscFv型抗体、Fab型抗体及び完全抗体からなる群から選択される、請求項5～7のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項9】

請求項1～4のいずれか1項に記載の蛍光免疫測定用標識抗体と抗原を接触させ、蛍光強度の変化を測定することを含む、抗原の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体のヌクレオチド結合部位を利用して、抗体を蛍光標識する方法、及び該方法により蛍光標識された蛍光免疫測定用標識抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

抗体のN末端部分に蛍光分子を結合させることで、抗原の結合を蛍光の変化により検出できる手法が開発されている（特許文献1及び特許文献2を参照）。この手法に用いる蛍光分子を結合させた、抗原の結合により蛍光強度が変化する抗体をQuenchbody（Q-body（登録商標））と呼ぶ。その開示においては、一例として無細胞翻訳系を用いて、蛍光分子を結合させたアミノ酸を抗体のN末端部分に導入することで、蛍光分子を結合させた抗体の合成を行っている。

【0003】

これらの例に限らず、従来手法においては、蛍光分子を結合させた抗体を合成する際に、手間と時間が掛かり、合成量も低いという問題点があった。それは、その合成に無細胞翻訳系を用いて蛍光分子を結合させたアミノ酸を抗体のN末端部分に導入する、という工程が必要となるためである。

また、抗体のN末端はタンパク質に翻訳された後に修飾を受ける可能性があり、もし修飾を受けた後はN末端に標識を適用できないという制約がある。

【0004】

一方、別の抗体特異的修飾法として紫外線照射による光化学修飾（UVクロスリンク）によって抗体のNBS（Nucleotide binding site）とインドール酪酸（IBA, indolebutyric acid）誘導体を結合させる方法が報告されている（特許文献3及び非特許文献1を参照）。抗体中の主にリジン残基に存在するアミノ基をターゲットとしてランダムに標識する従来の方法では抗体の機能を損ねることもあったが、光化学修飾を利用する方法では抗体の機能を損ねることなく、部位特異的に機能基（ビオチン、蛍光色素、iRGDペプチドや抗癌剤など）を結合することができるようになると報告されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特許第5043237号公報

【特許文献2】国際公開第2013/065314号

【特許文献3】国際公開第2014/152801号

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Alves, N, J et al., Biomaterials, 34, 5700～5710(2013)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

10

20

30

40

50

抗原の結合により蛍光強度が変化する抗体であるQ-bodyを合成するためには、組換え抗体技術の利用が一般的であった。本発明は、多くの抗体の可変領域内部に存在するヌクレオチド結合部位を利用して、光化学修飾法により、抗原の結合により蛍光強度が変化する抗体であるQ-bodyを作製する方法、及び得られたQ-bodyの提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、特許第5043237号公報及び国際公開第2013/065314号に記載のQ-bodyを開発し、抗原検出に利用していた。Q-bodyは抗体に抗原が結合していないときに、抗体の抗原結合部位から可変領域内部にわたり存在するトリプトファン残基の多い部位（以下抗原ポケットと呼ぶ）の近傍に位置しクエンチされている蛍光色素が、抗原が結合したときに蛍光を発するようになるか、あるいはよりクエンチされ、蛍光強度が変化することを利用して抗原を検出する。

10

【0009】

Q-bodyは遺伝子組換えの手法を利用して、抗体の軽鎖可変領域及び/又は重鎖可変領域のN末端に付加したペプチド中のアミノ酸を蛍光色素により標識するため、製造にコストと時間がかかっていた。

【0010】

本発明者らは、より簡便にQ-bodyを製造する方法について検討を行い、抗体の可変領域に存在するヌクレオチド結合部位（NBS）にインドール基が光化学修飾により結合することを利用し、抗体を蛍光色素で標識できることを見出した。この方法を利用することにより遺伝子組換えの手法によることなくあらかじめ作製された抗体可変領域を蛍光色素で簡便に標識することができた。

20

【0011】

また、抗体のヌクレオチド結合部位と抗原ポケットは近接して存在するため、光化学修飾を利用して製造したQ-bodyは、抗原が結合していないときによりクエンチされ、その結果、抗原が結合したときの蛍光強度の変化が大きくなり、従来Q-bodyよりも、より高感度で抗原を検出することができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

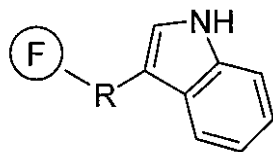
【0012】

[1]

下記式(1)：

30

【化1】



(1)

【0013】

(式中、Fは蛍光基であり、Rは、置換又は未置換の、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、C4～C10シクロアルキル基、C4～C10ヘテロシクリル基、C4～C10アリール基、C4～C10ヘテロアリール基、アリーレン基、エーテル基、エステル基、PEG基、スルフィド基、アミド基、ケトン基、スルファミド基及びそれらの組合せからなる群より選択されるリンカー基である)で表される、インドール酪酸(IBA)と蛍光基が結合している、抗体のヌクレオチド結合部位(NBS)標識用化合物が抗体内のヌクレオチド結合部位にコンジュゲートされている蛍光免疫測定用標識抗体。

40

【0014】

[2] 前記蛍光基が、ローダミン系、クマリン系、オキサジン系、カルボピロニン系、シアニン系、ピロメセン系、ナフタレン系、ピフェニル系、アントラセン系、フェナントレン系、ピレン系、カルバゾール系、Cy系、EVOblue系及びこれらの誘導体からなる群より選択される少なくとも1種である、[1]の蛍光免疫測定用標識抗体。

50

【0015】

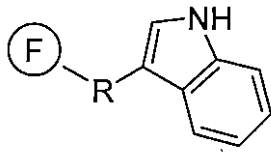
[3] 前記蛍光基が、テトラメチルローダミン、ローダミン110及びATTO655（登録商標）からなる群より選択される少なくとも1種を含む、[2]の蛍光免疫測定用標識抗体。

[4] 抗体がscFv型抗体、Fab型抗体及び完全型抗体からなる群から選択される、[1]～[3]のいずれかの蛍光免疫測定用標識抗体。

【0016】

[5] 蛍光免疫測定用標識抗体の製造方法であって、
下記式(1)：

【化2】



(1)

10

【0017】

(式中、Fは蛍光基であり、Rは、置換又は未置換の、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、C4～C10シクロアルキル基、C4～C10ヘテロシクリル基、C4～C10アリール基、C4～C10ヘテロアリール基、アリーレン基、エーテル基、エステル基、PEG基、スルフィド基、アミド基、ケトン基、スルファミド基及びそれらの組合せからなる群より選択されるリンカー基である)で表される、インドール酪酸(IBA)と蛍光基が結合している、抗体のヌクレオチド結合部位(NBS)標識用化合物と抗体を含む溶液に、中心波長254nmの紫外線を照射することにより、前記化合物のインドール基と抗体のヌクレオチド結合部位の間で光架橋反応を生じさせ、前記化合物と抗体をコンジュゲートする工程を含む、蛍光免疫測定用標識抗体の製造方法。

20

【0018】

[6] 前記蛍光基が、ローダミン系、クマリン系、オキサジン系、カルボピロニン系、シアニン系、ピロメセン系、ナフタレン系、ピフェニル系、アントラセン系、フェナントレン系、ピレン系、カルバゾール系、Cy系、EVOblue系及びこれらの誘導体からなる群より選択される少なくとも1種である、[5]の製造方法。

30

【0019】

[7] 前記蛍光基が、テトラメチルローダミン、ローダミン110及びATTO655（登録商標）からなる群より選択される少なくとも1種を含む、[6]の製造方法。

[8] 抗体がscFv型抗体、Fab型抗体及び完全抗体からなる群から選択される、[5]～[7]のいずれかの製造方法。

[9] [1]～[4]のいずれかの蛍光免疫測定用標識抗体と抗原を接触させ、蛍光強度の変化を測定することを含む、抗原の検出方法。

【発明の効果】

【0020】

本発明の蛍光免疫測定用試薬は、あらかじめ合成された抗体を用いて、短工程で短時間のうちに紫外線照射により翻訳後修飾を受けない抗原ポケット近傍の部位であるヌクレオチド結合部位を蛍光色素やクエンチャーにより特異的に修飾することができるので、あらゆる抗体に適用可能になる。そのため、材料である抗体の入手が容易になり、遺伝子解析も不要となる。これにより、抗原の結合を蛍光の変化により検出できる抗体の作成の簡便化と生産の効率化が可能になる。

40

【0021】

さらに、本発明においては、蛍光色素又はクエンチャーを含むヌクレオチド結合部位標識用化合物が抗原ポケットに近接したヌクレオチド結合部位に結合する。そのため、特許第5043237号公報や国際公開第2013/065314号に記載の標識抗体に比べ、蛍光色素又はクエンチャーはより抗原ポケットに近い位置に存在し、抗原ポケット内に入り易いので、抗原が結合していないときによりクエンチされやすくなる。そのため、特許第5043237号公報

50

や国際公開第2013/065314号に記載の標識抗体を用いた場合よりも、抗原が結合したときの蛍光強度の変化が大きくなるので、より高感度で抗原を測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】本発明の蛍光標識抗体の構造のパターンを示す図である。

【図2】本発明の蛍光標識抗体の標識パターンを示す図である。

【図3】本発明の蛍光標識抗体の蛍光が変化する原理を示す図である。

【図4】本発明の蛍光標識抗体とBGPペプチドとを反応させ、蛍光を検出した結果を示す図である。

【図5】アンバーサプレッション法で蛍光標識した蛍光標識抗体とBGPペプチドとを反応させ、蛍光を検出した結果を示す図である。

10

【発明を実施するための形態】

【0023】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、蛍光色素で標識した抗体を用いて抗原抗体反応を利用して、検査試料中に含まれる抗原である検査対象物質を測定する方法において用いる、蛍光色素で標識した蛍光免疫測定用抗体を作製する方法、及び蛍光色素で標識した蛍光免疫測定用抗体である。

【0024】

本発明の抗体を作製する方法においては、蛍光色素を抗体のヌクレオチド結合部位 (Nucleotide binding site; NBS) に対して親和性を有するインドール基を介して光化学修飾法等により結合させる。

20

【0025】

1. 本発明で用いる抗体

本発明においては、抗体として、抗体軽鎖可変領域 (VL) を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域 (VH) を含むポリペプチドの複合体を用いる。

【0026】

抗体軽鎖可変領域は、抗体軽鎖遺伝子のV領域及びJ領域のエクソンによりコードされる抗体軽鎖可変領域に特異的なアミノ酸配列を含むものであれば特に制限されるものではなく、上記抗体軽鎖可変領域に特異的なアミノ酸配列のN末端及び/又はC末端側に、さらに任意のアミノ酸配列が付加されたものであってもよい。また、上記抗体軽鎖可変領域に特異的なアミノ酸配列としては、カバット (Kabat) の番号付け系で第35番目のアミノ酸がトリプトファンであるアミノ酸配列であることが好ましい。抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドは、抗体軽鎖可変領域を含有していればよく、抗体軽鎖や、抗体軽鎖に任意のアミノ酸配列からなるペプチドを含むことができ、例えば、抗体軽鎖可変領域に、抗体軽鎖定常領域 (C) や、さらにヒンジ部分を付与したポリペプチドとすることができ、中でも抗体軽鎖可変領域にC を付与したポリペプチド等が好ましい。検出対象の抗原に応じて、抗原を認識し得る抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドを適宜作製することができる。

30

【0027】

抗体重鎖可変領域は、抗体重鎖遺伝子のV領域、D領域、及びJ領域のエクソンによりコードされる抗体重鎖可変領域に特異的なアミノ酸配列を含むものであれば特に制限されるものではなく、上記抗体重鎖可変領域に特異的なアミノ酸配列のN末端及び/又はC末端側に、さらに任意のアミノ酸配列が付加されたものであってもよい。また、上記抗体重鎖可変領域に特異的なアミノ酸配列としては、カバット (Kabat) の番号付け系で第36番目、第47番目、又は第103番目のアミノ酸がトリプトファンであるアミノ酸配列であることが好ましい。抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドは、抗体重鎖可変領域を含有していればよく、抗体重鎖や、抗体重鎖に任意のアミノ酸配列からなるペプチドを含むことができ、例えば、抗体重鎖可変領域に、抗体重鎖定常領域 (CH1) や、さらにヒンジ部分やFc領域を付与したポリペプチドとすることができ、中でも抗体重鎖可変領域にCH1を付与したポリペプチド等が好ましい。検出対象の抗原に応じて、抗原を認識し得る抗体重鎖可変

40

50

領域を含むポリペプチドを適宜作製することができる。

【0028】

抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドは、複合体を形成することが好ましく、抗体軽鎖可変領域及び抗体重鎖可変領域に、それぞれ複合体を形成するアミノ酸配列を含むペプチドが結合されたものであれば特に制限されるものではない。複合体を形成するペプチドとしては、上記抗体定常領域（CH1やC など）の他、2量体を形成する一方を抗体軽鎖可変領域に他方を抗体重鎖可変領域に付与することもできる。また、相互作用してこれらの複合体形成に寄与する2種類のタンパク質を選択することもできる。

【0029】

本発明において、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる、抗原と特異的に結合する複合体を抗体と呼ぶ。また、該複合体は抗原に結合するという抗体が有する特性を有しているので、抗原結合タンパク質と呼ぶこともできる。本発明の抗体は、後述のVH+VL型の抗体、scFv型抗体（一本鎖抗体：single chain variable fragment）、Fab型抗体、F(ab')₂型抗体、完全体型抗体（完全抗体）等を含む。

【0030】

本発明の抗体は、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドとを構成要素として含み、複合体を形成するものであればよく、本発明の蛍光標識された抗体の機能を損なわない限りは、前記抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドに加え、さらにペプチドやタンパク質、脂質、金属その他化合物等を構成要素として含んでもよい。

【0031】

また、本発明の抗体は、前記ポリペプチド同士が組み合わさって一体として機能し得る構造体であればよく、前記ポリペプチド間の化学結合の有無は特に問題とされない。前記結合としては、前記ポリペプチド同士による、ジスルフィド結合や、架橋剤を用いて形成された結合等を挙げることができ、これらの結合は1つの複合体において複数組み合わせで使用されてもよい。これらの中でもジスルフィド結合を好適に例示することができる。本発明の抗体は前記ポリペプチド同士が互いに近い距離となる複合体を形成することが好ましく、このような機能をもつペプチドを含む、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる複合体が好ましい。抗体分子において抗体軽鎖定常領域と抗体重鎖定常領域はその相互作用により抗体軽鎖可変領域と抗体重鎖可変領域をより近い距離とし、強固な抗原結合ポケットを形成する補助的役割を果たしている。このことから、本発明の抗原結合タンパク質としては、抗体軽鎖可変領域と抗体軽鎖定常領域からなるポリペプチドと、抗体重鎖可変領域と抗体重鎖定常領域からなるポリペプチドが、ジスルフィド結合で結合した1分子の抗体タンパク質であるFab型抗体や、Fab型抗体2つがヒンジを介してジスルフィド結合で結合したF(ab')₂型抗体や、完全型抗体が好ましい。この場合、抗体軽鎖可変領域と抗体軽鎖定常領域からなるポリペプチドは、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドであり、抗体重鎖可変領域と抗体重鎖定常領域からなるポリペプチドは、抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドである。また、本発明の抗体は、抗体軽鎖可変領域と抗体重鎖可変領域とからなるVH+VL型抗体又はscFv型抗体（一本鎖抗体：single chain variable region fragment）であってもよい。

【0032】

VH+VL型抗体、scFv型抗体及びFab型抗体は、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド1つと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド1つからなり、F(ab')₂型抗体及び完全体型抗体は、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド2つと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド2つからなる。

【0033】

本発明の抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからなる抗体において、抗体軽鎖可変領域と抗体重鎖可変領域からなる複合体部分が1つ

10

20

30

40

50

の蛍光色素で標識されている場合をシングルラベル（例えば、Fab型シングルラベル等）と呼ぶ。また、抗体軽鎖可変領域と抗体重鎖可変領域からなる複合体部分が2つの蛍光色素で標識されていてもよく、同じ種類の蛍光色素で標識されていてもよいし、別の種類の蛍光色素で標識されていてもよい。本発明において、抗体軽鎖可変領域と抗体重鎖可変領域からなる複合体部分が2つの蛍光色素により標識され、両方の蛍光色素が同じ種類である場合を同色ダブルラベル（例えば、Fab型同色ダブルラベル）と呼び、異なる場合を異色ダブルラベル（例えば、Fab型異色ダブルラベル）と呼ぶ。さらに、抗体軽鎖可変領域と抗体重鎖可変領域からなる複合体部分を、1つの蛍光色素と該蛍光色素に対する1つのクエンチャー（消光色素）の2つの色素で標識してもよく、このような抗体を蛍光+クエンチャーダブルラベルと呼ぶ。

10

【0034】

図1に抗体の構造を抗体パターンとして示す。図1においては、VH+VL型抗体、scFv型抗体、Fab型抗体、F(ab')₂型抗体及び完全型抗体の構造を示す。各型の抗体の抗体軽鎖可変領域と抗体重鎖可変領域からなる複合体部分は1つの色素で標識されているシングルラベルである。

【0035】

本発明においては、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドや、抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドや、これらのポリペプチドからなる複合体である抗体や、その構成要素等は、公知の化学合成法、遺伝子組換え技術、抗体分子のタンパク質分解酵素による分解方法等を用いて調製することができる。完全型抗体は、ハイブリドーマが産生したモノクローナル抗体をそのまま用いることができる。また、完全型抗体をパインやペプシン等のタンパク質分解酵素で分解することにより、Fab型抗体やscFv型抗体を得ることができる。また、抗体を遺伝子組換え技術により調製してもよい。遺伝子組換え技術により前記ポリペプチドを調製する場合には、かかるポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNAを好適な発現ベクターに導入して組換えベクターを作製し、バクテリア、酵母、昆虫、動植物細胞などを宿主として用いた発現系や、無細胞翻訳系により目的のポリペプチドを発現させることができる。無細胞翻訳系において目的のポリペプチドの発現を行う場合は、例えば、大腸菌、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球等の無細胞抽出液に、ヌクレオチド3リン酸や各種アミノ酸を加えた反応液中で、目的のポリペプチドを発現させることができる。この際、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドや、抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドはProXタグやFLAGタグ、Hisタグ等のタグが付加されていてもよく、これらのタグはポリペプチドの精製等に利用することができる。このようにして得た抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドや、抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド同士は、蛍光色素による標識の前後に、適当な溶媒中で複合体を形成させることができ、ジスルフィド結合又は架橋剤により結合させ、複合体を形成させる例を挙げることができる。例えば、前記抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド及び抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドをコードする遺伝子を、大腸菌無細胞合成系で共発現後、4で16時間インキュベーションすることによりジスルフィド結合を形成させ複合体を形成することができる。また、大腸菌無細胞合成反応系にタンパク質ジスルフィドイソメラーゼやプロリンシストランシイソメラーゼなどの分子シャペロンを添加することによりジスルフィド結合を促進することができる。また、前記架橋剤としては、ポリペプチド同士を架橋し結合させうる化合物であればよく、例えば、アルデヒド類（例えば、グルタルアルデヒド）、カルボジイミド類、イミドエステル類など挙げることができる。適宜市販品を入手し常法により使用することができる。また、本発明の複合体は、抗体を酵素などで切断して作製することもでき、例えばパインや、ペプシンを用いて抗体を処理することにより、それぞれFab型抗体や、F(ab')₂型抗体を作製することもできる。

20

30

40

【0036】

本発明の蛍光色素で標識された抗体は、抗体が抗原に結合したときに、抗体が抗原に結合していないときに対して、蛍光の発生の有無や、蛍光強度が変化するように設計されている。すなわち、標識抗体が抗原に結合していないときには、標識に用いた蛍光色素がク

50

エンチ（消光）されて蛍光を発しないか、特定の波長の蛍光を発生する状態にあり、抗体に抗原が結合した場合に、蛍光色素の蛍光の発生状態が変化する。例えば、抗体と抗原が結合していない状態でクエンチ状態にあった蛍光色素が抗体と抗原が結合することにより蛍光を発するようになるか、あるいは抗体と抗原が結合していない状態で蛍光を発していた蛍光色素が抗体と抗原が結合することにより発生する蛍光の波長がシフトする。このような抗体として、クエンチャー（消光色素）により蛍光強度の変化が生じる抗体、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）により蛍光色素の発光状態が変化する抗体が挙げられる。すなわち、本発明においては、検出対象物質である抗原と該検出対象物質に対する抗体が複合体を形成したときの蛍光強度が変化し得る抗体を用いる。

【0037】

蛍光強度が変化し得る抗体として、（１）抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド及び抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドからなる抗体が抗原と結合して複合体を形成したときにクエンチが解消されて蛍光強度が増加する抗体と（２）前記抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド及び抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドからなる抗体が抗原と結合して複合体を形成したときに、該抗原と抗体の複合体が前記蛍光色素のクエンチャーとなり、該抗原と前記抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド及び抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドの複合体が形成したときに前記蛍光色素がより強くクエンチされることにより蛍光強度が減少する抗体が挙げられる。前者の抗体を用いた場合、検出対象である抗原濃度と蛍光色素の蛍光強度が正の相関関係にあり、該抗体を検出対象である抗原濃度と蛍光色素の蛍光強度が正の相関関係にある抗体という。該抗体により、検査試料中の検出対象物質である抗原の濃度と前記抗体が抗原に結合したときに発する蛍光強度とが正の相関にあることを指標として、抗原を検出することができる。後者の抗体を用いた場合、検出対象である抗原濃度と蛍光色素の蛍光強度が負の相関関係にあり、該抗体を検出対象である抗原濃度と蛍光色素の蛍光強度が負の相関関係にある抗体という。該抗体により、検査試料中の検出対象物質である抗原の濃度と前記抗体が抗原に結合したときに発する蛍光強度とが負の相関にあることを指標として、抗原を検出することができる。

【0038】

特に抗体のVH領域に存在するトリプトファン残基をクエンチャー（消光色素）として利用する蛍光標識抗体が挙げられる。抗体のVH領域の第36番目、第47番目、第103番目（Kab atの番号付け系による）にはトリプトファン（W）残基が存在し、これらのトリプトファン残基はクエンチャーとして作用している（特許第5043237号公報）。蛍光色素で標識した抗体が抗原に結合したときに、蛍光色素は抗原ポケット内に位置するか近傍に位置することにより蛍光色素がトリプトファン残基の近傍に位置しトリプトファン残基と相互作用して蛍光色素がクエンチするように設計されている。すなわち、該蛍光標識抗体は抗原に結合していない状態では、クエンチされており、蛍光を発しない。

【0039】

抗原濃度と蛍光色素の蛍光強度が正の相関関係にある抗体を用いた場合、抗体に抗原が結合すると、抗体の立体構造が変化し、トリプトファンの近傍に位置していた蛍光色素はトリプトファンから離れ、トリプトファンと相互作用しなくなり、クエンチが解除され、蛍光を発するようになる。さらに、抗体が2つの蛍光色素で標識されている場合、（おそらく両方の蛍光色素が抗体の抗原結合ポケットに入り込み、）2つの蛍光色素の間でも相互作用が生じ、蛍光色素間のクエンチング効果（H-dimer形成）が得られるが、抗体に抗原が結合すると、抗体の立体構造が変化し、2つの蛍光色素が離れ、クエンチング効果が消失する。すなわち、抗原が存在する場合、抗体と抗原が結合し、抗体の立体構造が変化し、蛍光色素のクエンチが解除され、蛍光を発するようになる。さらに、抗体が1つの蛍光色素と1つのクエンチャーで標識されている場合、抗原がない場合には蛍光色素とクエンチャーが相互作用し、クエンチャーにより蛍光色素がクエンチされる。抗体に抗原が結合すると、抗体の立体構造が変化し、クエンチャーと蛍光標識抗体の蛍光色素が離れて相互作用しなくなり、クエンチが解除され、蛍光を発するようになる。この蛍光を測定することにより、抗原の存在を検出ことができ、また蛍光強度により抗原を定量すること

10

20

30

40

50

もできる。

【0040】

このように、抗原濃度と蛍光色素の蛍光強度が正の相関関係にある抗体を用いて抗原濃度を測定し、又は抗原を検出する場合、抗原結合タンパク質に結合する抗原が多くなるほど、蛍光強度が増加する。

【0041】

一方、抗原濃度と蛍光色素の蛍光強度が負の相関関係にある抗体を用いた場合、抗原と抗体の複合体が蛍光色素にクエンチャーとして作用し、蛍光色素はさらにクエンチされ、蛍光色素が発生する蛍光の蛍光強度は弱くなる。この際、抗体の標識に用いられた蛍光色素は、抗体の抗原結合ポケット中に位置し、重鎖可変領域のトリプトファンとより近接した位置に存在し、トリプトファンとの相互作用がより強くなり、クエンチされる。抗体が2つの蛍光色素で標識されている場合、両方の蛍光色素が抗体の抗原結合ポケットに入り込み、2つの蛍光色素の間でも相互作用が生じ、蛍光色素間のクエンチング効果(H-dimer形成)が得られる。この際、2つの蛍光色素を用いて抗体を標識しており、2つの蛍光色素が異なる蛍光色素であり、蛍光共鳴エネルギー移動のエネルギー供与体(ドナー)となる供与体色素とエネルギー受容体(アクセプター)となる受容体色素の組み合わせとなる場合、抗体が抗原と結合したとき、両方の蛍光色素すなわちエネルギー供与体とエネルギー受容体の向きが変化し、エネルギー供与体が発するエネルギーからのエネルギー受容体への蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)が生じなくなり、発生する蛍光の蛍光強度が弱くなる。すなわち、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと抗体重鎖可変領域ポリペプチドからなり、前記抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと抗体重鎖可変領域ポリペプチドが1つ又は2つの蛍光色素により標識されている抗体を用いて抗原を測定、検出する場合、トリプトファン残基によるクエンチング、蛍光色素間のクエンチングに加え、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)効果によるクエンチングの効果が得られ、クエンチがより大きくなる。蛍光色素は抗原と抗体の複合体と疎水的相互作用や静電的相互作用等により相互作用し、クエンチの程度が強くなる。

10

20

【0042】

このように、抗原濃度と蛍光色素の蛍光強度が負の相関関係にある抗体を用いて抗原濃度を測定し、又は抗原を検出する場合、抗原結合タンパク質に結合する抗原が多くなるほど、蛍光色素から発生する蛍光がクエンチされ、蛍光強度が低下する。すなわち、前記抗体が検出対象の抗原と結合して複合体を形成したときに、抗原と抗体の複合体が前記蛍光色素のクエンチャーとなり、液相中の抗原濃度と上記蛍光色素の蛍光強度とが負の相関関係にあり、抗原と抗体の複合体が形成したときに前記蛍光色素がより強くクエンチされることにより蛍光強度が減少する。

30

【0043】

抗原濃度と蛍光色素の蛍光強度が負の相関関係にある抗体の例として、ハイブリドーマA-04が産生するモノクローナル抗体が挙げられ、該ハイブリドーマA-04は、2014年11月20日付で、独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE) 特許微生物寄託センター(NITE Patent Microorganisms Depository)(日本国 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室)に受託番号NITE BP-01970(「識別の表示」は、「A-04」)で国際寄託されている。

40

【0044】

本発明の抗体を構成する抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド及び抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドは、モノクローナル抗体由来のものを用いることができる。すなわち、検査対象物質である抗原を免疫原として用いて常法でモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得て該ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体の抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド及び抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドを利用することができる。また、前記ハイブリドーマが産生したモノクローナル抗体を完全体型抗体として用いることもできる。さらに、前記ハイブリドーマより、抗体軽鎖可変領域をコードするDNA及び抗体重鎖可変領域をコードするDNAを得て、該DNAを用いてリコンビナントタンパク質として、抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチド及び抗体重鎖可変領域を含むポリペプチドからな

50

る抗体を製造することもできる。

【0045】

本発明において抗体軽鎖可変領域 (VL) を含むポリペプチドと抗体重鎖可変領域 (VH) を含むポリペプチドからなり、1つ又は2つの蛍光色素により標識されている抗体を Q-body (登録商標) と呼ぶ。

【0046】

2. 光化学修飾法等による抗体の蛍光標識

本発明においては、抗体の可変領域の内部に存在する、芳香族アミノ酸により形成されたヌクレオチド結合部位 (Nucleotide binding site; NBS) を利用し、光化学修飾法等の結合方法により抗体を蛍光色素で標識し、蛍光免疫測定用抗体 (Q-body) を作製する。

【0047】

抗体の可変領域中のヌクレオチド結合部位は、軽鎖可変領域と重鎖可変領域の4つの芳香族アミノ酸により形成されている。4つの芳香族アミノ酸は、軽鎖可変領域の位置42のチロシン又はフェニルアラニン、軽鎖可変領域の位置103のチロシン又はフェニルアラニン、重鎖可変領域の位置103のチロシン、及び重鎖可変領域の位置118のトリプトファンである (位置は、IMGT (登録商標) (the international ImmunoGeneTics database) の番号付による) (Alves, N, J et al., Biomaterials, 34, 5700~5710(2013))。抗体のヌクレオチド結合部位は、抗原が結合する抗原ポケットの近傍に位置する。

【0048】

蛍光色素による抗体の標識は、ヌクレオチド結合部位に親和性を有するインドール基を介して抗体に蛍光色素を結合させればよい。具体的には、インドール酪酸 (Indolebutyric acid; IBA) に蛍光色素を結合させ、抗体のヌクレオチド結合部位標識用化合物を作製し、該ヌクレオチド結合部位標識用化合物と抗体を混合し、光化学修飾法により抗体のヌクレオチド結合部位にインドール基を結合させればよい。また、光化学修飾法によらなくても、ヌクレオチド結合部位とインドール基の相互作用により両者は結合し得る。

ヌクレオチド結合部位標識用化合物に結合させる蛍光色素を蛍光基ともいう。

【0049】

1分子のヌクレオチド結合部位標識用化合物は、1つの蛍光色素を有していてもよいし、複数の蛍光色素を有していてもよい。また、1つの蛍光色素と1つのクエンチャーを有していてもよい。1つの蛍光色素を有するヌクレオチド結合部位標識用化合物を抗体の抗体軽鎖可変領域と抗体重鎖可変領域からなる複合体部分に結合させた場合の標識パターンをシングルラベルといい、2つの蛍光色素を有するヌクレオチド結合部位標識用化合物を抗体の抗体軽鎖可変領域と抗体重鎖可変領域からなる複合体部分に結合させた場合の標識パターンをダブルラベルという。2つの蛍光色素が同じ種類である場合、同色ダブルラベルといい、2つの蛍光色素が異なる種類である場合、異色ダブルラベルという。さらに、1つの蛍光色素と1つのクエンチャーを有するヌクレオチド結合部位標識用化合物を抗体の抗体軽鎖可変領域と抗体重鎖可変領域からなる複合体部分に結合させた場合の標識パターンを蛍光+クエンチャーダブルラベルという。

【0050】

図2に抗体としてFab型抗体を用いた場合の各標識パターンを示す。図中、NBSはヌクレオチド結合部位を示し、IBAはインドール酪酸を示す。図には、シングルラベル、同色ダブルラベル、異色ダブルラベル及び蛍光+クエンチャーダブルラベルの各標識パターンを示してある。

【0051】

インドール酪酸と蛍光色素との間にはリンカーを存在させることにより、蛍光色素とインドール酪酸との間の距離を調節することができる。リンカーが1本である場合、ヌクレオチド結合部位標識用化合物に結合する蛍光色素は1つであるが、リンカーを分岐させることによりヌクレオチド結合部位標識用化合物に2つの蛍光色素あるいは1つの蛍光色素と1つのクエンチャーを結合させることができる。インドール酪酸と蛍光色素との結合は公知の化学合成法により行うことができる。

10

20

30

40

50

【0052】

ヌクレオチド結合部位標識用化合物を抗体に結合させた場合、ヌクレオチド結合部位標識用化合物の蛍光色素やクエンチャーは疎水的であるため、蛍光色素やクエンチャーは自発的に抗体内の疎水的な環境である抗原ポケット内に位置するか、あるいは抗原ポケットの近傍に位置するようになり、構造的に安定化する。この結果、抗原ポケットを構成しているトリプトファンと蛍光色素が近接し、蛍光色素がクエンチされる。また、蛍光色素が複数ある場合、それらが抗原ポケット内又はその近傍に集まるため、H-dimer形成等の蛍光色素どうしの相互作用によりクエンチされる。さらに、蛍光色素とクエンチャーの組合せの場合、蛍光色素とクエンチャーが抗原ポケット内又はその近傍に集まるために、クエンチャーにより蛍光色素がクエンチされる。

10

【0053】

抗原の結合により蛍光色素からの蛍光の強度が変化する原理を図3に示す。図では抗体がscFv型抗体の場合を示してある。インドール酪酸と蛍光色素が結合したヌクレオチド結合部位標識用化合物を抗体と混合するとインドール基がヌクレオチド結合部位(NBS)に結合し、ヌクレオチド結合部位標識用化合物の蛍光色素が抗体のヌクレオチド結合部位内に位置し、クエンチされる。抗原が抗体に結合すると、蛍光色素がヌクレオチド結合部位から離れクエンチが解除され、蛍光を発するようになる。

【0054】

本発明においては、蛍光色素又はクエンチャーを含むヌクレオチド結合部位標識用化合物が抗原ポケットに近接したヌクレオチド結合部位に結合する。そのため、特許第5043237号公報や国際公開第2013/065314号に記載の標識抗体に比べ、蛍光色素又はクエンチャーはより抗原ポケットに近い位置に存在するため、抗原ポケット内に入り易いので、抗原が結合していないときのクエンチ効果が大きくなる。そのため、特許第5043237号公報や国際公開第2013/065314号に記載の標識抗体を用いた場合よりも、抗原が結合したときの蛍光強度の変化が大きくなるので、より高感度で抗原を測定することができる。

20

【0055】

抗体の種類により、ヌクレオチド結合部位から抗原ポケットまでの距離には違いがある。従って、蛍光色素が抗原ポケット内又はその近傍に位置するように、ヌクレオチド結合部位と抗原ポケットまでの距離に応じて、ヌクレオチド結合部位標識用化合物のヌクレオチド結合部位から蛍光色素又はクエンチャーまでの長さを調節する必要がある。このためには、ヌクレオチド結合部位標識用化合物中のヌクレオチド結合部位に結合するインドール基部分から蛍光色素又はクエンチャーまでの長さをリンカーの長さにより調節すればよい。リンカーとしては、置換又は未置換の、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、C4~C10シクロアルキル基、C4~C10ヘテロシクリル基、C4~C10アリール基、C4~C10ヘテロアリール基、アリーレン基、エーテル基、エステル基、PEG基、スルフィド基、アミド基、ケトン基、スルファミド基及びそれらの組合せからなる群より選択されるリンカー基を用いることができる。

30

【0056】

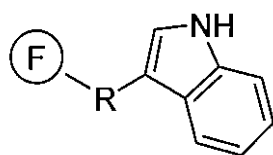
蛍光色素とインドール酪酸を結合させたヌクレオチド結合部位標識用化合物であって、1つの蛍光色素を結合させた化合物としては、以下の化合物が挙げられる。

40

【0057】

下記式(1)：

【化3】



(1)

【0058】

(式中、Fは蛍光色素であり、Rは、置換又は未置換の、アルキル基、アルケニル基、ア

50

ルキニル基、C4～C10シクロアルキル基、C4～C10ヘテロシクリル基、C4～C10アリアル基、C4～C10ヘテロアリアル基、アリーレン基、エーテル基、エステル基、PEG基、スルフィド基、アミド基、ケトン基、スルファミド基及びそれらの組合せからなる群より選択されるリンカー基である)で表される、インドール酪酸(IBA)と蛍光色素が結合した、抗体のヌクレオチド結合部位(NBS)標識用化合物。

【0059】

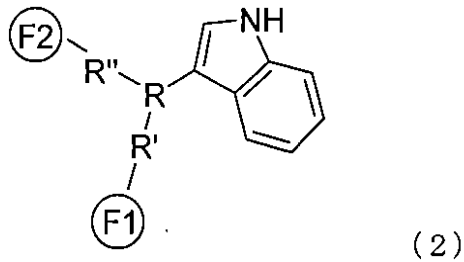
蛍光色素とインドール酪酸を結合させたヌクレオチド結合部位標識用化合物であって、2つの蛍光色素を結合させた化合物としては、以下の化合物が挙げられる。

【0060】

下記式(2)：

10

【化4】



【0061】

20

(式中、F1及びF2は蛍光色素であり、F1とF2は同じ種類の蛍光色素であっても、異なる種類の蛍光色素であってもよく、R、R'及びR''は、独立に置換又は未置換の、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、C4～C10シクロアルキル基、C4～C10ヘテロシクリル基、C4～C10アリアル基、C4～C10ヘテロアリアル基、アリーレン基、エーテル基、エステル基、PEG基、スルフィド基、アミド基、ケトン基、スルファミド基及びそれらの組合せからなる群より選択されるリンカー基である)で表される、インドール酪酸(IBA)と蛍光色素が結合した、抗体のヌクレオチド結合部位(NBS)標識用化合物。

【0062】

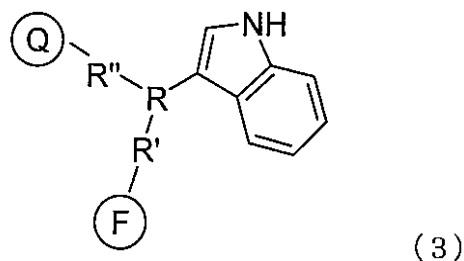
30

蛍光色素とインドール酪酸を結合させたヌクレオチド結合部位標識用化合物であって、1つの蛍光色素と1つのクエンチャーを結合させた化合物としては、以下の化合物が挙げられる。

【0063】

下記式(3)：

【化5】



40

【0064】

(式中、Fは蛍光色素であり、Qはクエンチャーであり、R、R'及びR''は、独立に置換又は未置換の、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、C4～C10シクロアルキル基、C4～C10ヘテロシクリル基、C4～C10アリアル基、C4～C10ヘテロアリアル基、アリーレン基、エーテル基、エステル基、PEG基、スルフィド基、アミド基、ケトン基、スルファミド基及びそれらの組合せからなる群より選択されるリンカー基である)で表される、インドール酪酸(IBA)と蛍光色素が結合した、抗体のヌクレオチド結合部位

50

(NBS) 標識用化合物。

【0065】

抗体の蛍光標識に用いる蛍光色素としては、ローダミン系、クマリン系、オキサジン系、カルボピロニン系、シアニン系、ピロメセン系、ナフタレン系、ピフェニル系、アントラセン系、フェナントレン系、ピレン系、カルバゾール系、Cy系、EVOBlue系の蛍光色素やその蛍光色素の誘導体を例示することができる。ここで、例えば、ローダミン系の蛍光色素とは、ローダミン骨格を有する蛍光色素をいう。具体的には、TAMRA(カルボキシテトラメチルローダミン: carbocytetremethylrhodamine)、CR6G(カルボキシローダミン6G: Carboxyrhodamine 6G)、ATTO655(商標名)、CR110(カルボキシローダミン110: carboxyrhodamine 110)(ローダミン110)、Rhodamine Green(商標名)、BODIPY FL(商標名)、4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、BODIPY 493/503(商標名)、4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-8-propionic acid、BODIPY R6G(商標名)、4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、BODIPY 558/568(商標名)、4,4-difluoro-5-(2-thienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、BODIPY 564/570(商標名)、4,4-difluoro-5-styryl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、BODIPY 576/589(商標名)、4,4-difluoro-5-(2-pyrrolyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、BODIPY 581/591(商標名)、4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、Cy3(商標名)、Cy3B(商標名)、Cy3.5(商標名)、Cy5(商標名)、Cy5.5(商標名)、EvoBlue10(商標名)、EvoBlue30(商標名)、MR121、ATTO 390(商標名)、ATTO 425(商標名)、ATTO 465(商標名)、ATTO488(商標名)、ATTO 495(商標名)、ATTO 520(商標名)、ATTO 532(商標名)、ATTO Rho6G(商標名)、ATTO 550(商標名)、ATTO 565(商標名)、ATTO Rho3B(商標名)、ATTO Rho11(商標名)、ATTO Rho12(商標名)、ATTO Thio12(商標名)、ATTO 610(商標名)、ATTO 611X(商標名)、ATTO 620(商標名)、ATTO Rho14(商標名)、ATTO 633(商標名)、ATTO 647(商標名)、ATTO 647N(商標名)、ATTO 655(商標名)、ATTO Oxa12(商標名)、ATTO 700(商標名)、ATTO 725(商標名)、ATTO 740(商標名)、Alexa Fluor 350(商標名)、Alexa Fluor 405(商標名)、Alexa Fluor 430(商標名)、Alexa Fluor 488(商標名)、Alexa Fluor 532(商標名)、Alexa Fluor 546(商標名)、Alexa Fluor 555(商標名)、Alexa Fluor 568(商標名)、Alexa Fluor 594(商標名)、Alexa Fluor 633(商標名)、Alexa Fluor 647(商標名)、Alexa Fluor 680(商標名)、Alexa Fluor 700(商標名)、Alexa Fluor 750(商標名)、Alexa Fluor 790(商標名)、Rhodamine Red-X(商標名)、Texas Red-X(商標名)、5(6)-TAMRA-X(商標名)、5TAMRA(商標名)、SFX(商標名)を挙げることができるが、中でも、Cy3、EvoBlue10、ローダミン系蛍光色素であるTAMRAやCR110、及びオキサジン系蛍光色素であるATTO655を特に好適に例示することができる。

【0066】

上記蛍光色素中、同色ダブルラベルに対しては、TAMRAとTAMRAの組合せが特に好ましく、異色ダブルラベルに対しては、TAMRAとCR110の組合せ及びTAMRAとATTO 655の組合せが特に好ましい。

【0067】

なお、蛍光色素によっては、極性に依り蛍光強度を変化させる極性感受性を有するものがある(M. Renard et al., J. Mol. Biol. (2002) 318, 429-442)。例えば、IANBD、CNBD、Acrylodan、5-IAF等が挙げられる。これらの蛍光色素で標識した抗体を用いて蛍光クエンチングに基づく測定を行う場合、抗原が結合することにより蛍光色素が溶媒から遮蔽され、蛍光色素がクエンチャーと接触する機会が減少することによりさらにクエンチが進む。本発明においては、上記のような極性感受性を有する蛍光色素は除外され、極性感受性に基づかないクエンチの原理により抗原を測定し又は検出する。

【0068】

消光色素(クエンチャー)としては、NBD: 7-nitrobenzofurazan、DABCYL、BHQ、ATTO

、QXL、QSY、Cy、Lowa Black、IRDYE等を基本骨格とする消光色素やその消光色素の誘導体が挙げられる。具体的には、NBD、DABCYL、BHQ-1(商標)、BHQ-2(商標)、BHQ-3(商標)、ATTO540Q(商標)、ATTO580Q(商標)、ATTO612Q(商標)、QXL490(商標)、QXL520(商標)、QXL570(商標)、QXL610(商標)、QXL670(商標)、QXL680(商標)、QSY-35(商標)、QSY-7(商標)、QSY-9(商標)、QSY-21(商標)、Cy5Q(商標)、Cy7Q(商標)、Lowa Black FQ(商標)、LowaBlack RQ(商標)、IRDYE QC-1(商標)等を用いることができる。これらの中でも、NBDが好ましい。

【0069】

本発明の標識抗体のうち、標識パターンが蛍光+クエンチャーダブルラベルである抗体の蛍光色素とクエンチャーの組み合わせとして、例えば、TAMRAとNBDの組み合わせを挙げることができる。

10

【0070】

ヌクレオチド結合部位標識用化合物と抗体のヌクレオチド結合部位とのインドール基を介した結合は、光化学修飾法を利用して行う。具体的には、ヌクレオチド結合部位標識用化合物と抗体を混合し、中心波長254nmの紫外線を照射し、前記化合物と抗体の間で光架橋反応を生じさせればよい。

【0071】

光化学修飾法には、ピーク波長が254nmの紫外光光源を用いればよく、例えば、UVクロスリネカーCL-1000シリーズ(UVP LLC社)等のUV照射装置を用いることができる。

【0072】

照射する光量は、処理する化合物の量にもよるが、例えば、照射面で0.5~10J/cm²程度である。また、所要照射時間も限定されないが、数十秒~数分程度照射すればよい。

20

【0073】

本発明は、上記の1つの蛍光色素を有するヌクレオチド結合部位標識用化合物、2つの蛍光色素を有するヌクレオチド結合部位標識用化合物、及び1つの蛍光色素と1つのクエンチャーを有するヌクレオチド結合部位標識用化合物を包含する。

【0074】

さらに、本発明はこれらのヌクレオチド結合部位標識用化合物により標識された抗体(V+L型抗体、scFv型抗体、Fab型抗体、F(ab')₂型抗体及び完全型抗体)を包含する。ヌクレオチド結合部位標識用化合物により標識された抗体をヌクレオチド結合部位(NBS)標識用化合物を抗体内のヌクレオチド結合部位にコンジュゲートされた蛍光免疫測定用標識抗体ともいう。

30

【0075】

なお、蛍光色素又はクエンチャーを有するヌクレオチド結合部位標識用化合物を抗体に結合させることをコンジュゲートするともいい、ヌクレオチド結合部位標識用化合物により標識された抗体をヌクレオチド結合部位標識用化合物と抗体とのコンジュゲートともいう。ここでコンジュゲートするとは共有結合により結合させることも、静電相互作用等の相互作用により非共有的に結合させることも含む。

【0076】

3. 蛍光免疫測定用標識抗体を用いた抗原の測定

40

本発明の蛍光免疫測定用標識抗体と抗原を接触させ、抗原を接触させる前と接触させた後の蛍光色素が発する蛍光強度の変化を測定することにより、抗原を検出することができる。抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド及び抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドからなる抗体が抗原と結合して複合体を形成したときにクエンチが解消されて蛍光強度が増加する抗体を用いた場合、抗原が抗体に結合することにより、蛍光強度は増加する。一方、抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド及び抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドが抗原と結合して複合体を形成したときに、該抗原と抗体の複合体が前記蛍光色素のクエンチャーとなり、該抗原と前記抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド及び抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドの複合体が形成したときに前記蛍光色素がより強くクエンチされることにより蛍光強度が減少する抗体を用いた場合、抗原が抗体に結合することにより、蛍光強度は

50

減少する。

【0077】

この際、予め蛍光免疫測定用標識抗体と既知の量の抗原が含まれる被験試料を混合接触させ、その際の蛍光の変化を測定し、検量線を作成しておくことが好ましい。あるいは、検出を行う際に、複数の既知の量の抗原を含むコントロール試料を準備しておき、コントロール試料についても同時に測定を行い検量線を作成してもよい。測定された蛍光と検量線から被験試料中の抗原の量を算出することができる。

【0078】

本発明の蛍光免疫測定用標識抗体を用いた抗原の検出方法における蛍光の測定には、通常、蛍光検出に用いる光源や測定装置を用いることができる。光源としては励起光波長を照射できるものであればよく、具体的には水銀ランプ、キセノンランプ、LED（発光ダイオード）、レーザー光等が挙げられる。この際、適当な蛍光フィルターを用いて特定の波長の励起光を得ることができる。蛍光測定装置としては、例えば、励起光の光源及びその照射システム、蛍光画像取得システム等を備えた蛍光顕微鏡等を利用することができ、例えば、MF20/FluoroPoint-Light（オリンパス社製）やFMB10-III（日立ソフトウェアエンジニアリング社製）等が挙げられる。また、光源、照射システム、測定システムを備えた小型で持ち運び可能な蛍光検出装置を用いてもよい。このような小型の装置を用いることにより、被験試料を採取して実験室に運んで測定することなく、採取現場で抗原を検出することが可能になる。なお蛍光の検出は、蛍光スペクトルの検出であっても、特定の波長の蛍光強度の検出であってもよい。

10

20

【0079】

また、本発明の蛍光免疫測定用標識抗体を用いた抗原の検出方法において、照射する励起光及び、測定及び/又は検出する蛍光の波長は、使用する蛍光色素の種類に応じて適宜選択すればよい。例えば蛍光色素にCR110を用いた場合は励起光波長480nmと蛍光波長530nmを用い、TAMRAを用いた場合は励起光波長530nmと蛍光波長580nmを用い、ATTO655を用いた場合は励起光波長630nmと蛍光波長680nmを用いればよい。また、2種類の異なる蛍光色素を用いる場合も、抗原濃度を測定及び/又は抗原を検出することができる、励起光波長及び蛍光波長の組み合わせを適宜選択して使用すればよい。

【0080】

本発明の蛍光免疫測定用標識抗体を用いた抗原の検出における検出対象物質は抗原抗体反応により検出し得る抗原であり、抗原としては、抗体重鎖可変領域を含むポリペプチド及び上記抗体軽鎖可変領域を含むポリペプチドにより特異的に認識される抗原であれば特に制限されず、例えば、タンパク質、ペプチド、糖質、脂質、糖脂質、低分子化合物等を挙げることができる。すなわち、本発明の方法において、検出対象物質である抗原はイムノアッセイ、すなわち抗原抗体反応を利用したアッセイで測定し得る抗原又は抗体である。抗原としては抗体を作製し得るものなら如何なる抗原でもよく、例えば、タンパク質、多糖類、脂質、糖脂質等が挙げられる。これらの物質を含む原生動物、真菌、細菌、マイコプラズマ、リケッチア、クラミジア、ウイルス、動物組織等も検出し得る。また、麻薬、爆薬、農薬、香料、公害物質等の低分子化合物を含む化学物質も測定対象となり得る。このような物質として、例えば、テトラヒドロカンナビノール（THC）、テトラヒドロカンナビノール酸（THC-A）、カンナビノール（CBN）、カンナビジオール（CBD）等のカンナビノイドと呼ばれる大麻成分、アンフェタミン、メタンフェタミン、モルヒネ、ヘロイン、コデインなどの覚せい剤や麻薬類；アフラトキシン、ステリグマトシスチン、ネオソラニオール、ニバレノール、フモニシン、オクラトキシン、エンドファイト産生毒素などのカビ毒；テストステロンやエストラジオールなどの性ホルモン；クレンプテロールやラクTOPAMINなどの飼料に不正に用いられる添加物；PCB、ゴシポール、ヒスタミン、ベンツピレン、メラミン、アクリルアミド、ダイオキシンなどの有害物質；アセタミプリド、イミダクロプリド、クロルフェナピル、マラチオン、カルバリル、クロチアニジン、トリフルミゾール、クロロタロニル、スピノサド、ランネート、メタミドホス、クロルピリホスなどの残留農薬；ビスフェノールAなどの環境ホルモンなどが挙げることができる。テトラ

30

40

50

ヒドロカンナビノール (THC) には、二重結合の位置異性体があり、⁸-THCと⁹-THCがある。THCという場合、⁸-THCも⁹-THCも含まれる。上記の物質は各物質の誘導体も含む。

【0081】

検査試料も限定されず、血液、血清、血漿、尿、唾液、髄液等の生体由来体液試料、培養上清、細胞抽出液、菌体抽出液、廃水や、アレルゲン等の動物組織由来物質、麻薬等が付着している可能性がある物質を紙等で拭った試料等が挙げられる。

本発明の検出は液系で行うので、上記試料は適宜生理食塩水や緩衝液に懸濁、溶解又は液浸させて検出すればよい。

本発明は、上記の蛍光免疫測定用標識抗体を用いて抗原を検出する方法を包含する。

10

さらに、本発明は上記の蛍光免疫測定用標識抗体を含む抗原を検出するためのキットも包含する。

【実施例】

【0082】

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0083】

実施例1 光架橋法によるQbodyの調製

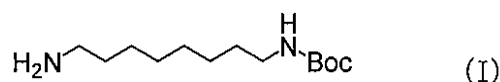
(1) 5(6)-TAMRA-C8-IBA(TAMRA-IBA)の作製

【0084】

20

(i) Boc-C8-NH₂合成

【化6】



【0085】

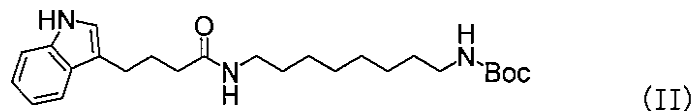
Diaminooctane(Sigma-Aldrich)(500mg, 3.5mmol)をMethylene chloride 5mLに溶解させ、さらに4 にてBoc anhydride(151mg, 0.69mmol, 1mL in CH₂Cl₂)溶液を滴下混合した。4 で30分間放置後に、室温にて終夜反応を続けた。反応後エバポレーターにて溶媒を乾燥後に、飽和Na₂CO₃水溶液で洗浄し、NaSO₄にて脱水することでBoc-C8-NH₂(式I)を得た。

30

【0086】

(ii) Boc-C8-IBAの合成

【化7】



【0087】

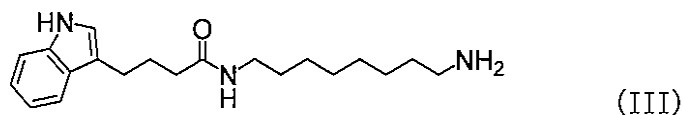
Indole-3-butanoic acid, IBA(43mg, 0.24mmol)と1,1'-Carbonyldiimidazole, CDI(59mg, 0.36mmol)をanhydrous THF (150mL)で溶解させ、1.5h, 室温にて放置した後に、Boc-C8-NH₂(119mg, 0.49mmol)を混合し、室温にて終夜反応させた。反応後にエバポレーターにて溶媒を乾燥後、酢酸エチルに溶かし、4% NaHCO₃及び5% KHSO₄にてそれぞれ洗浄を行い、NaSO₄にて脱水し、エバポレーターにて乾燥させることでBoc-C8-IBA(式II)を得た。

40

【0088】

(iii) NH₂-C8-IBAの合成

【化8】



50

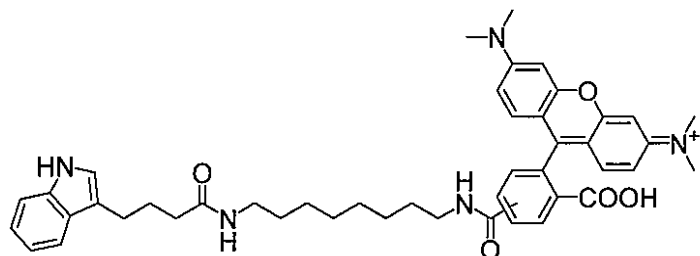
【 0 0 8 9 】

Boc-C8-IBA 30mgにTFA200 μ Lを氷上で混合し15分間放置し、エバポレーターにより乾燥させることでNH₂-C8-IBA(式III)を得た。

【 0 0 9 0 】

(iv) 5(6)-TAMRA-C8-IBAの合成

【 化 9 】



(IV)

10

【 0 0 9 1 】

20 μ L NH₂-C8-IBA/DMSO(100mM)、20 μ L 5(6)-TAMRA-SE(Setareh biotech)/DMSO、40 μ Lの100mM NaHCO₃水溶液を1.5mLチューブに加え、氷上で混和することで反応させた。この溶液から高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により合成物を分取し、乾燥させることで5(6)-TAMRA-C8-IBA(式IV)を得た。この乾燥物を所定の濃度となるようにDMSOに溶かした。

20

【 0 0 9 2 】

(2) 抗BGP(ヒトオステオカルシン: human Bone Gla Protein)抗体(scFv)の作製

(i) 材料

KOD-Plus、T4 DNAポリメラーゼ及びLigation-high ligationキットは、東洋紡社から入手した。制限酵素及びE coli SHuffle T7 Express lysYは、New England Biolabs社から入手した。オリゴヌクレオチドは、Operon-Eurofins社から入手した。PureYield plasmid miniprepキットは、プロメガ社から入手した。タロン金属親和性樹脂とタロンディスプレイカラムは、タカラバイオ社から入手した。限外濾過装置(遠心フィルターチューブ Ultra-4、MWCO 3 k)はMillipore社から入手した。TCEP固定化TCEPジスルフィド還元ゲル及びZebaスピン脱塩カラム(MWCO 7 k)はThermo Pierce社から入手した。His Mag Sepharose Niは、GEヘルスケアから入手した。アンチDYKDDDDKタグ抗体磁気ビーズ、DYKDDDDK(配列番号1)ペプチド、Supersep PAGEゲル及び銀染色キットは、和光純薬工業から入手した。Nanosep centrifugal-3K限外濾過装置は、ポール・コーポレーション社から入手した。

30

【 0 0 9 3 】

(ii) scFv型Q-体遺伝子の構築

抗BGP抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をコードするDNAを含むFab型Q-body発現ベクターpUQ1H(KTM219)(Abe R. et al., Scientific Reports, 4: 4640)をEcoRV及びBamHIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑化した後、ライゲーションを行いL鎖フラグメントを削除した。H鎖フラグメントを削除するために、AgeI及びEagIによって消化し、Ligation-high ligationキットを用いてAgeI及びEagIで消化したKTM219のscFvフラグメントとライゲーションした。次いで、プライマーKTMAgeBack(5'-GGAATTCACCCGGTCAAGTAAAGCTGCAGCAGTC-3')(配列番号2)及びT7term(5'-TGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3')(配列番号3)により、鋳型としてのPROX-FL92.1amber(KTM219)及びKOD plus DNAポリメラーゼを用いて増幅した。Flagタグを挿入するために、ライゲーションした遺伝子を、プライマーKTMAgeBackとpROXHis6Bamfor(5'-GTCGGATCCGCCATGATGATGATGATGATAAC-3')(配列番号4)で増幅し、次いでAgeI及びBamHIにより消化し、その後AgeI及びEagIで消化したpUQ1H(KTM219)とライゲーションし、pSQ(KTM219)を得た。得られたプラスミドをPureYield plasmid miniprepシステムで調製し、コード領域の全体の配列を同定した。

40

【 0 0 9 4 】

50

(iii) 合成及びタンパク質の精製

SHuffle T7 Express lysY細胞をPSQ (KTM219) で形質転換し、LBA培地 (100 µg/mLのアンピシリンを含むLB培地) 及び1.5%寒天中で30℃、16時間培養した。単一コロニーをとり、OD₆₀₀が0.9に達するまで、4mLのLBA培地中で30℃で増殖させ、1.6mlを100mlのLBA培地に接種した。細胞をOD₆₀₀が0.6に達するまで30℃で培養し、0.4mMのガラクトピラノシドイソプロピルを添加した。溶液をさらに16℃で16時間インキュベートし、次いで遠心分離 (8,000 × gで、20分間、4℃) した。ペレットを10mlのTalon洗浄緩衝液 (50mMリン酸、0.3 M塩化ナトリウム (NaCl)、5mMイミダゾール、pH7.4) 中に懸濁し、次いで、超音波処理した。遠心分離 (8,000 × gで、20分間、4℃) 後、上清を25℃で30分間、回転ホイール上で0.2 mLのTalon金属樹脂と共にインキュベートした。ビーズを、8mLのTalon洗浄緩衝液で3回洗浄した。4mLのTalon溶出緩衝液 (50mMリン酸塩、0.3M NaCl、0.5Mイミダゾール、pH7.4) を添加し30分間25℃でインキュベーションした後、溶離液をTalonディスプレイ重力カラムを使用して回収した。溶離液を限外濾過装置にかけ、PBST (10mMリン酸塩、137mM塩化ナトリウム、2.7mM塩化カリウム、0.05% Tween 20、pH7.4) で平衡化し、250 µLに濃縮した。タンパク質の発現及び精製は、SDS-PAGE分析を用いて確認し、タンパク質濃度を、標準として様々な濃度のウシ血清アルブミン (BSA) を用いて、ImageJソフトウェア (国立衛生研究所、ベセスダ、MD) を用いて決定した。

10

【0095】

pSQ(KTM219)中のタグのついたscFvのアミノ酸配列を配列番号5に示す。配列番号5中、GGSHHHHHGGSDYKDDDDK (配列番号6) で表される配列がタグ部分の配列である。

20

【0096】

(3) 光架橋法による蛍光免疫測定用標識抗体の調製及び該抗体の検定

(1) で調製した3 nmolのTAMRA-IBAと(2) で調製した0.2nmol (5 µg) の抗BGP抗体 (scFv) を10 µLのPBSに入れ、25℃で1時間インキュベーションした。次いで、抗BGP抗体とTAMRA-IBAの混合溶液に波長254nmのUVを照射面で1 J/cm²の光量となるよう2分40秒間照射した。この際、使用した照射装置はUVP CL-1000 (UVP LLC社製) であった。

【0097】

次いで、His-tagを用いてタンパク質を精製し、Ultra filtration (メンブレンフィルタ) によりバッファー交換を行い、さらにFlag-tagを用いてタンパク質精製を行った。

【0098】

抗原ペプチドBGP-C7 (BGPのC末端アミノ酸配列NH₂-RRFYGPV-COOH) (配列番号7) の濃度を0 M ~ 1 × 10⁻⁵Mまで8段階に変えた抗原溶液と、精製した抗体を混合し、励起波長546 nmで照射し、蛍光強度の変化を調べた。

30

【0099】

結果を図4に示す。図5には、アンバーサプレッション法 (Ellman J et al., (1991) Methods Enzymol. 202: 301-36; 国際公開第2011/061944号) によりTAMRAで標識した抗BGP抗体 (scFv) を用いたときの結果である。図5に結果を示す実験においては、スペーサーを含む又は含まないTAMRA標識抗BGP抗体 (scFv) をBGP-C7と反応させた。G3S(1)、G3S(2) 及びG3S(3)のスペーサー配列は、それぞれGGGS (配列番号8)、GGSGGGGS (配列番号9) 及びGGGSGGGSGGGGS (配列番号10) であった。図4に示すように、BGP-C7の濃度が増加するにつれて、蛍光強度が増加した。また、図5の結果と比較すると、光架橋法により標識した抗体 (scFv) はアンバーサプレッション法により標識した抗体 (scFv) よりも、蛍光の上昇が著しかった。この結果は、光架橋法により標識した抗体 (scFv) はBGP-C7の存在を高感度で分析できる蛍光免疫測定用標識抗体であることを示す。

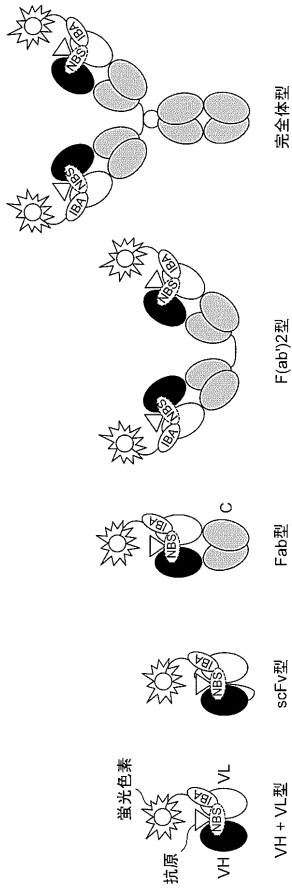
40

【産業上の利用可能性】

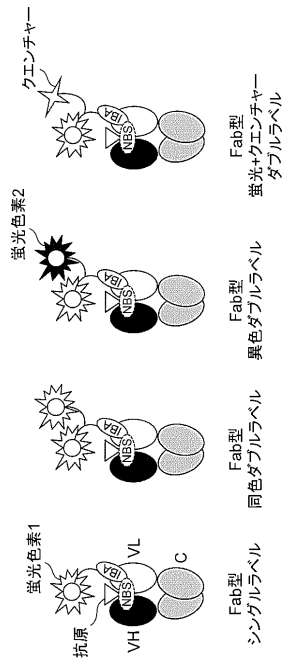
【0100】

本発明の蛍光免疫測定用標識抗体を用いることにより、各種抗体を高感度で検出することができる。

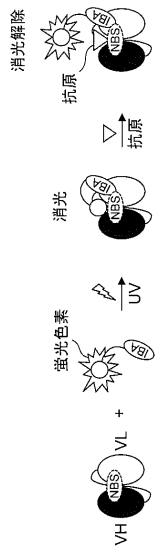
【 図 1 】



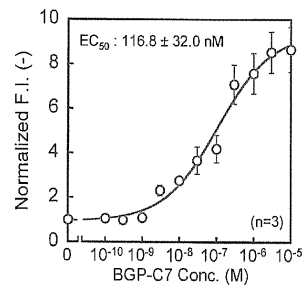
【 図 2 】



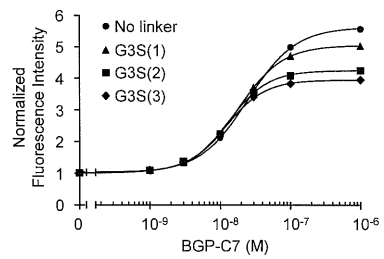
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【配列表】

2017049184000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 鄭 熙陳

東京都目黒区大岡山 2 丁目 1 2 番 1 号 国立大学法人東京工業大学内

(72)発明者 董 金華

東京都目黒区大岡山 2 丁目 1 2 番 1 号 国立大学法人東京工業大学内

(72)発明者 阿部 亮二

神奈川県横浜市青葉区元石川町 6 4 0 9 ウシオ電機株式会社内

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA16 CA04 EA01 KA02 KA03

4H045 AA11 BA70 CA40 DA76 EA50 FA50 FA74

专利名称(译)	使用抗体的核苷酸结合位点 (NBS) 荧光标记的抗体		
公开(公告)号	JP2017049184A	公开(公告)日	2017-03-09
申请号	JP2015174075	申请日	2015-09-03
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人東京工業大学 优志旺电机株式会社		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人東京工業大学 潮公司		
[标]发明人	上田宏 鄭熙陳 董金華 阿部亮二		
发明人	上田 宏 鄭 熙陳 董 金華 阿部 亮二		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/64 C07K16/18		
CPC分类号	G01N21/64 C07K16/18 G01N33/533		
FI分类号	G01N33/533 G01N21/64.ZNA.F C07K16/18 G01N21/64.FZN.A		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/CA04 2G043/EA01 2G043/KA02 2G043/KA03 4H045/AA11 4H045/BA70 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA50 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种通过使用抗体的可变区内存在的核苷酸结合位点，通过光化学修饰法，通过抗原的结合而改变了荧光强度的荧光标记抗体的制造方法，并提供得到的荧光标记抗体。。 解决方案：下式(1)：[化学1] (式中，F为荧光基，R为取代或未取代的烷基，烯基，炔基，C4-C10环烷基，C4-C10杂环基，C4-C10芳基，C4- C 10为选自杂芳基，亚芳基，醚基，酯基，PEG基，硫醚基，酰胺基，酮基，亚磺酰胺基及其组合，吡啶的连接基。用于荧光免疫测定的标记抗体，其中结合有用于标记抗体的核苷酸结合位点 (NBS) 的化合物，其中结合了丁酸 (IBA) 和荧光基团，该化合物与抗体中的核苷酸结合位点缀合。
[选择图]无

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公開特許公報 (A)	(11) 特許出願公開番号 特開2017-49184 (P2017-49184)
		(43) 公開日 平成29年3月9日 (2017.3.9)
(5) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/533 (2006.01)	GO 1 N 33/533	2 G 0 4 3
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64	Z N A F 4 H 0 4 5
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 16/18	
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 22 頁)		
(21) 出願番号 (22) 出願日	特願2015-174075 (P2015-174075) 平成27年9月3日 (2015.9.3)	(71) 出願人 304021417 国立大学法人東京工業大学 東京都目黒区大岡山2丁目12番1号 (71) 出願人 000102212 ウシオ電機株式会社 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号 (74) 代理人 100091096 弁理士 平木 祐輔 (74) 代理人 100118773 弁理士 藤田 郎 (74) 代理人 100111741 弁理士 田中 夏夫 (72) 発明者 上田 宏 東京都目黒区大岡山2丁目12番1号 国立大学法人東京工業大学内 最終頁に続く
(54) 【発明の名称】	抗体のヌクレオチド結合部位 (NBS) を利用して蛍光標識された抗体	