

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/104626

発行日 平成30年10月11日(2018.10.11)

(43) 国際公開日 **平成29年6月22日(2017.6.22)**

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|-----------------------|-------------|
| GO 1 N 33/543 (2006.01) | GO 1 N 33/543 5 2 5 W | 4 B 0 2 9 |
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 Y | 4 B 0 6 3 |
| GO 1 N 33/569 (2006.01) | GO 1 N 33/569 | |
| C 1 2 M 1/40 (2006.01) | C 1 2 M 1/40 Z | |
| C 1 2 Q 1/00 (2006.01) | C 1 2 Q 1/00 C | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

| | | | |
|--------------|------------------------------|----------|--|
| 出願番号 | 特願2017-556050 (P2017-556050) | (71) 出願人 | 000155023 株式会社堀場製作所 京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地 |
| (21) 国際出願番号 | PCT/JP2016/086946 | (74) 代理人 | 100080791 弁理士 高島 一 |
| (22) 国際出願日 | 平成28年12月12日(2016.12.12) | (74) 代理人 | 100125070 弁理士 土井 京子 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2015-244569 (P2015-244569) | (74) 代理人 | 100136629 弁理士 鎌田 光宜 |
| (32) 優先日 | 平成27年12月15日(2015.12.15) | (74) 代理人 | 100121212 弁理士 田村 弥栄子 |
| (33) 優先権主張国 | 日本国(JP) | (74) 代理人 | 100174296 弁理士 菅麻 博文 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2016-182211 (P2016-182211) | (74) 代理人 | 100137729 弁理士 赤井 厚子 |
| (32) 優先日 | 平成28年9月16日(2016.9.16) | | |
| (33) 優先権主張国 | 日本国(JP) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】担体に固相化された抗体から微生物、細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞またはウイルスを除去する方法

(57) 【要約】

本発明は、抗原としての微生物、細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞またはウイルスが結合している、担体上に固相化された抗体から該微生物等を除去する方法を提供する。本発明はまた、抗原としての微生物等が結合している、担体上に固相化された抗体から該微生物等を除去することを含む、該微生物等の免疫学的検出方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原としての微生物、細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞またはウイルスが結合している抗体が固相化されている担体表面上でゲル（第一ゲル）を流動させることを含む、該抗体から該微生物、該細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞または該ウイルスを除去する方法。

【請求項 2】

該第一ゲルが多糖類のゲルまたはタンパク質のゲルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

該多糖類がアガロース、寒天およびカラギーナンからなる群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

該タンパク質がゼラチンである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

該第一ゲルの破断強度が $4 - 1100 \text{ g/cm}^2$ である、請求項 1 - 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

該微生物が大腸菌 (*Escherichia coli*)、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) または緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) であり、該細胞が動物細胞であり、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞がエクソソームである、請求項 1 - 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 7】

該第一ゲルがさらに塩水溶液を含む混合物であり、かつ該流動後、洗浄し、第一ゲルと同一または異なるゲル（第二ゲル）を再度流動させることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

該第一ゲルおよび該第二ゲルが多糖類のゲルまたはタンパク質のゲルである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

該多糖類がアガロース、寒天およびカラギーナンからなる群から選択される、請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 10】

該タンパク質がゼラチンである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

該第一ゲルがアガロースゲルであり、該第二ゲルがゼラチンゲルである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 12】

該第一ゲルおよび該第二ゲルの破断強度が $4 - 1100 \text{ g/cm}^2$ である、請求項 7 - 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

該塩水溶液が硫酸アンモニウム水溶液である、請求項 7 - 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 14】

該微生物が大腸菌 (*Escherichia coli*)、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) または緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) であり、該細胞が動物細胞であり、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞がエクソソームである、請求項 7 - 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

抗原としての微生物、細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞またはウイルスが結合している抗体が固相化されている担体表面上でゲル（第一ゲル）を流動させることによって該抗体から該微生物、該細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞または該

50

ウイルスを除去し、被験試料を該担体に接触させ、免疫学的手法で該微生物、該細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞または該ウイルスを検出することを含む、該微生物、該細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞または該ウイルスの免疫学的検出方法。

【請求項 16】

該第一ゲルがさらに塩水溶液を含む混合物であり、かつ該流動後、洗浄し、第一ゲルと同一または異なるゲル（第二ゲル）を再度流動させることをさらに含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

抗原としての微生物、細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞またはウイルスが結合している抗体が固相化されている担体表面上でゲルを流動させる機構を含む、該抗体から該微生物、該細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞または該ウイルスを除去する装置。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、微生物、細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞またはウイルスの免疫学的検出方法に用いるための、担体に固相化された抗体から該微生物、該細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞または該ウイルスを除去する方法に関する。さらに本発明は、担体に固相化された抗体から該微生物、該細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞または該ウイルスを除去し、新たに抗原としての微生物、細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞またはウイルスを該担体に接触させ、免疫学的手法で該微生物、該細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞または該ウイルスを検出することを含む、該微生物、該細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞または該ウイルスの免疫学的検出方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

公衆衛生の行き届いた現代においても、細菌感染症は重要な疾病と位置づけられる。例えば、食品流通のコールドチェーンの整備と大規模化により、しばしば腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic Escherichia coli ; EHEC) を中心とした食中毒が大きな問題となる。EHEC感染症の原因菌は、ベロ毒素 (Verotoxin ; VT) を産生する大腸菌である。EHEC感染症においては、無症状から致死的なものまで様々な臨床症状が知られている。特に、腸管出血性大腸菌感染に引き続いて発症することがある溶血性尿毒症症候群 (HUS) は、死亡あるいは腎機能や神経学的障害などの後遺症を残す可能性のある重篤な疾患である。EHEC感染症の発生予防や拡大防止につなげるためにも、EHECの混入対象を特定することは重要である。

30

【0003】

患者及び保菌者から検出されるEHECとしては多様な血清型が知られており、我が国においては、O157がもっとも多く、O26とO111がそれに次ぐ。EHECの検出においては、EHECの外膜表面に共通に存在するO抗原を検出標的とすることが標準的である。O抗原を利用したEHECの検出は、免疫学的検出方法によって実施することができる。免疫学的検出法は、抗原抗体反応を利用して抗原の検出を行うもので、一般に検出精度が優れているばかりでなく、迅速、簡便かつ経済的な検出法である。免疫学的検出方法においては、用いる抗体は遊離抗体であっても担体に固相化された抗体であってもよいが、抗体を再利用し安価かつ大量に被験試料を処理するという観点から、担体に固相化された抗体を用いることが好ましい。その場合、担体に固相化された抗体に結合した抗原は、容易に抗体から除去されなければならない。抗原の除去によって、抗体を固相化された担体は、再度の抗原を検出できる状態になる。しかしながら、抗原として細菌を検出する場合、EHECを含む細菌を捕捉するための抗体を用いて細菌を検出すると、その後細菌と抗体間の結合が解消できず、一度細菌の検出方法に用いた抗体を固相化した担体は使い捨てなければならない、経済的負担

40

50

が大きいという問題があった（非特許文献1）。

ヒトの細胞においても、免疫細胞の分類や組織中でのガン細胞の検出などのために、医療現場や基礎医学研究室などで、免疫学的検出方法は汎用されている。また、最近になって、細胞の分泌するエクソソームが細胞間の信号伝達に大きな役割を果たしていることが明らかになってきた。これらのエクソソームの検出にも、その表面タンパク質に対する免疫学的検出方法が有効である。しかしながら、細胞やエクソソームの検出においても、細菌の場合と同様に、検出後の細胞もしくはエクソソームと抗体間の結合が解消できないため、その方法を提示することができなかつた。すなわち、検出に用いた担体は自作するなどして使い捨てなければならず、経済的負担が大きいという問題があった（非特許文献2-4）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Bulard, E.; Bouchet-Spinelli, A.; Chaud, P.; Roget, A.; Calemczuk, R.; Fort, S.; Livache, T. Carbohydrates as New Probes for the Identification of Closely Related Escherichia coli Strains Using Surface Plasmon Resonance Imaging. Anal. Chem. 2015, 87, 1804-1811.

【非特許文献2】Kato, K.; Ishimuro, T.; Arima, Y.; Hirata, I, Iwata, H. High-Throughput Immunophenotyping by Surface Plasmon Resonance Imaging. Anal. Chem. 2007, 79, 8616-8623.

【非特許文献3】L. M. Rupert, D.; Lasser, C.; Eldh, M.; Block, S.; P. Zhdanov, V.; O. Lotvall, J.; Bally, M.; Hook, F. Determination of Exosome Concentration in Solution Using Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. Anal. Chem. 2014, 86, 5929-5936.

【非特許文献4】Yang, C.; Mejjard, R.; J. Griesser, H.; O. Bagnaninchi, P.; Thierry, B. Cellular Micromotion Monitored by Long-Range Surface Plasmon Resonance with Optical Fluctuation Analysis. Anal. Chem. 2015, 87, 1456-1461.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、抗原としての微生物、細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞またはウイルスが結合している、担体上に固相化された抗体から該微生物、該細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞または該ウイルスを除去する方法を提供することを目的とする。本発明はまた、抗原としての微生物、細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞またはウイルスが結合している、担体上に固相化された抗体から該微生物、該細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞または該ウイルスを除去し、新たに抗原としての微生物、細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞またはウイルスを該担体に接触させ、免疫学的手法で該微生物、該細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞または該ウイルスを検出することを含む、該微生物、該細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞または該ウイルスの免疫学的検出方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、担体に固相化されている抗体から抗原としての微生物、細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞またはウイルスを除去する方法を提供すべく鋭意研究を行った結果、該担体表面上でゲルを流動させることによって該抗体から該微生物、該細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞または該ウイルスを除去できることを見出し、本発明を完成した。

【0007】

すなわち、本発明は、

[1] 抗原としての微生物、細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞またはウイル

10

20

30

40

50

スが結合している抗体が固相化されている担体表面上でゲル（第一ゲル）を流動させることを含む、該抗体から該微生物、該細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞または該ウイルスを除去する方法；

[2] 該第一ゲルが多糖類のゲルまたはタンパク質のゲルである、[1] に記載の方法；

[3] 該多糖類がアガロース、寒天およびカラギーナンからなる群から選択される、[2] に記載の方法；

[4] 該タンパク質がゼラチンである、[2] に記載の方法；

[5] 該第一ゲルの破断強度が4 - 1100 g/cm²である、[1] - [4] のいずれか1つに記載の方法；

[6] 該微生物が大腸菌(*Escherichia coli*)、肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)または緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)であり、該細胞が動物細胞であり、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞がエクソソームである、[1] - [5] のいずれか1つに記載の方法；

[7] 該第一ゲルがさらに塩水溶液を含む混合物であり、かつ該流動後、洗浄し、第一ゲルと同一または異なるゲル（第二ゲル）を再度流動させることをさらに含む、[1] に記載の方法；

[8] 該第一ゲルおよび該第二ゲルが多糖類のゲルまたはタンパク質のゲルである、[7] に記載の方法；

[9] 該多糖類がアガロース、寒天およびカラギーナンからなる群から選択される、[8] に記載の方法；

[10] 該タンパク質がゼラチンである、[8] に記載の方法；

[11] 該第一ゲルがアガロースゲルであり、該第二ゲルがゼラチンゲルである、[7] に記載の方法；

[12] 該第一ゲルおよび該第二ゲルの破断強度が4 - 1100 g/cm²である、[7] - [11] のいずれか1つに記載の方法；

[13] 該塩水溶液が硫酸アンモニウム水溶液である、[7] - [12] のいずれか1つに記載の方法；

[14] 該微生物が大腸菌(*Escherichia coli*)、肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)または緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)であり、該細胞が動物細胞であり、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞がエクソソームである、[7] - [13] のいずれか1つに記載の方法；

[15] 抗原としての微生物、細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞またはウイルスが結合している抗体が固相化されている担体表面上でゲル（第一ゲル）を流動させることによって該抗体から該微生物、該細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞または該ウイルスを除去し、被験試料を該担体に接触させ、免疫学的手法で該微生物、該細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞または該ウイルスを検出することを含む、該微生物、該細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞または該ウイルスの免疫学的検出方法；

[16] 該第一ゲルがさらに塩水溶液を含む混合物であり、かつ該流動後、洗浄し、第一ゲルと同一または異なるゲル（第二ゲル）を再度流動させることをさらに含む、[15] に記載の方法；

[17] 抗原としての微生物、細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞またはウイルスが結合している抗体が固相化されている担体表面上でゲルを流動させる機構を含む、該抗体から該微生物、該細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する該小胞または該ウイルスを除去する装置；

を提供する。

【発明の効果】

【0008】

本発明の抗体から抗原としての微生物、細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞またはウイルスを除去する方法を用いることによって、従来は再利用に適さなかった該抗

10

20

30

40

50

体を再利用することが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】マイクロアレイ型SPR装置（（株）堀場製作所：OpenPlex）に付属したFlow-cellを示す図である。

【図2】マイクロアレイ型SPR装置（（株）堀場製作所：OpenPlex）専用のバイオチップ（（株）堀場製作所：CS-HD）を示す図である。網掛け部は抗体が固相化された部分を示す。六角形枠は図1におけるGasketが接触する場所を示す。

【図3】大腸菌(0111、0157)のO抗原に対する抗体を固相化したセンサーチップ表面への大腸菌の結合によって誘起されるSPR現象に伴う反射光の変化量を示す図である。縦軸：反射率（%）、横軸：時間（秒）

10

【図4】肺炎球菌(35B、15B/C)の莢膜抗原に対する抗体を固相化したセンサーチップ表面への肺炎球菌の結合によって誘起されるSPR現象に伴う反射光の変化量を示す図である。縦軸：反射率（%）、横軸：時間（秒）

【図5】大腸菌(026、091)のO抗原に対する抗体を固相化したセンサーチップ表面への大腸菌の結合によって誘起されるSPR現象に伴う反射光の変化量を示す図である。縦軸：反射率（%）、横軸：時間（秒）

【図6】大腸菌(0103、0115)のO抗原に対する抗体を固相化したセンサーチップ表面への大腸菌の結合によって誘起されるSPR現象に伴う反射光の変化量を示す図である。縦軸：反射率（%）、横軸：時間（秒）

20

【図7】大腸菌(0121、0128)のO抗原に対する抗体を固相化したセンサーチップ表面への大腸菌の結合によって誘起されるSPR現象に伴う反射光の変化量を示す図である。縦軸：反射率（%）、横軸：時間（秒）

【図8】大腸菌(0145、0159)のO抗原に対する抗体を固相化したセンサーチップ表面への大腸菌の結合によって誘起されるSPR現象に伴う反射光の変化量を示す図である。縦軸：反射率（%）、横軸：時間（秒）

【図9】HCT116由来エクソソームのCD9に対する抗体を固相化したセンサーチップ表面へのエクソソームの結合によって誘起されるSPR現象に伴う反射光の変化量を示す図である。縦軸：反射率（%）、横軸：時間（秒）

【図10】マウス肥満細胞のCD117に対する抗体を固相化したセンサーチップ表面への肥満細胞の結合によって誘起されるSPR現象に伴う反射光の変化量を示す図である。縦軸：反射率（%）、横軸：時間（秒）

30

【図11】緑膿菌に対する抗体を固相化したセンサーチップ表面への緑膿菌の結合によって誘起されるSPR現象に伴う反射光の変化量を示す図である。縦軸：反射率（%）、横軸：時間（秒）

【図12】抗原が結合している抗体が固相化されている担体表面上でゲルを流動させる機構を含む、抗原を除去する装置を示す図である。ゲル/サンプル/バッファー用インレットおよびアウトレット：被験試料、洗浄バッファー。ゲルの供給口および排出口、三方弁およびゲル用ループ：ゲルの供給調整弁、供給調整用ループ。フローセル：図1を参照。

【発明を実施するための形態】

40

【0010】

本発明は、抗原としての微生物、細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞（以下、単なる「小胞」と記載する場合もある）またはウイルス（以下、「抗原としての微生物、細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞またはウイルス」を「微生物等」と記載する場合もある）が結合している抗体が固相化されている担体表面上でゲル（以下、本発明の第一ゲルと記載する場合もある）を流動させることを含む、該抗体から該微生物等を除去する方法（以下、本発明の除去方法Iと記載する場合もある）を提供する。好ましくは、本発明の抗原は、微生物、細胞または該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞である。

【0011】

50

本発明の除去方法 I で抗体に結合している微生物としては、真正細菌（以下、単なる「細菌」と記載する）、古細菌が挙げられるが、その中でも細菌が好ましい。細菌は、グリセロール3-リン酸の脂肪酸エステルより構成される細胞膜を持つ原核生物であれば特に制限はなく、グラム陰性細菌であってもよいし、グラム陽性細菌であってもよい。グラム陰性細菌としては、以下に制限されるものではないが、例えば、ナイセリア属(*Neisseria*)、ブランハメラ属(*Branhamella*)、ヘモフィルス属(*Haemophilus*)、ボルデテラ属(*Bordetella*)、エシェリキア属(*Escherichia*)、シトロバクター属(*Citrobacter*)、サルモネラ属(*Salmonella*)、シゲリア属(*Shigella*)、クレブシエラ属(*Klebsiella*)、エンテロバクター属(*Enterobacter*)、セラチア属(*Serratia*)、ハフニア属(*Hafnia*)、プロテウス属(*Proteus*)、モルガネラ属(*Morganella*)、プロビデンシア属(*Providencia*)、エルシニア属(*Yersinia*)、キャンピロバクター属(*Campylobacter*)、ビブリオ属(*Vibrio*)、エロモナス属(*Aeromonas*)、シュードモナス属(*Pseudomonas*)、キサントモナス属(*Xanthomonas*)、アシネトバクター属(*Acinetobacter*)、フラボバクテリウム属(*Flavobacterium*)、ブルセラ属(*Brucella*)、レジオネラ属(*Legionella*)、ベイロネラ属(*Veillonella*)、バクテロイデス属(*Bacteroides*)、フゾバクテリウム属(*Fusobacterium*)などに属する細菌が挙げられるが、その中でもエシェリキア属(*Escherichia*)またはシュードモナス属(*Pseudomonas*)に属する細菌が好ましい。本発明の除去方法 I で抗体に結合しているエシェリキア属(*Escherichia*)に属する具体的な細菌としては、大腸菌(*Escherichia coli*)が挙げられ、好ましくは026株、091株、0103株、0111株、0115株、0121株、0128株、0145株、0157株および0159株が挙げられる。また、本発明の除去方法 I で抗体に結合しているシュードモナス属(*Pseudomonas*)に属する具体的な細菌としては、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)が挙げられ、好ましくはNCTC12924株が挙げられる。グラム陽性細菌としては、以下に制限されるものではないが、例えば、スタフィロコッカス属(*Staphylococcus*)、ストレプトコッカス属(*Streptococcus*)、エンテロコッカス属(*Enterococcus*)、コリネバクテリウム属(*Corynebacterium*)、バシラス属(*Bacillus*)、リステリア属(*Listeria*)、ペプトコッカス属(*Peptococcus*)、ペプトストレプトコッカス属(*Peptostreptococcus*)、クロストリジウム属(*Clostridium*)、ユーバクテリウム属(*Eubacterium*)、プロピオニバクテリウム属(*Propionibacterium*)、ラクトバシラス属(*Lactobacillus*)などに属する細菌が挙げられる。本発明の除去方法 I で抗体に結合しているストレプトコッカス属(*Streptococcus*)に属する具体的な細菌としては、肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)が挙げられ、好ましくは血清型15B/Cが挙げられる。

本発明の除去方法 I で抗体に結合している細胞としては、真核生物の細胞であれば特に制限はなく、動物細胞、植物細胞、真菌を含む概念として定義するが、その中でも動物細胞が好ましい。動物細胞としては、以下に制限されるものではないが、例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、線維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞などが挙げられ、その中でも肥満細胞が好ましい。

本発明の除去方法 I で抗体に結合している小胞としては、最外膜として脂質二重膜を有する小胞であれば特に制限はなく、例えば、エクソソーム、細胞外小胞、膜小胞、エクソソーム様小胞等が挙げられる。

本発明の除去方法 I で抗体に結合しているウイルスとしては、カプシドタイプのウイルスとエンベロープタイプのウイルスが挙げられる。

【0012】

本発明の除去方法 I において、上記の微生物等が結合する抗体としては、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体をとともに包含する。また、当該抗体は、IgG、IgA、IgM、IgDまたはIgEのいずれの免疫グロブリンクラスに属するものであってもよいが、好ましくはIgGである。本発明の抗体は目的の微生物等に結合する市販の抗体や研究機関に保存

されている抗体を使用してもよい。あるいは、当業者であれば、下記の通りに目的の微生物等に結合する抗体を作製することができる。

【0013】

ポリクローナル抗体は、例えば以下の方法により作製することができる。上記の微生物等自体または微生物等の一部分（例えば、細菌であれば、O抗原、F抗原、H抗原、K抗原など、動物細胞、エクソソームであれば膜タンパク質など）を感作抗原として、ウサギ、マウス、ラット、ヤギ、モルモットまたはハムスター等の哺乳動物やニワトリ等の鳥類に免疫（初回免疫から約1～4週間毎に1～数回追加免疫する）し、各追加免疫の約3～10日後に部分採血した血清の抗体価を従来公知の抗原抗体反応を利用して測定、その上昇を確認しておく。さらに、最終免疫から約3～10日後全血を採取して抗血清を精製する。ポリクローナル抗体は、硫酸分画等の塩析、遠心分離、透析、カラムクロマトグラフィー等の慣用の分離技術を用いて単独の免疫グロブリンクラスとして精製することもできる。

10

【0014】

また、モノクローナル抗体は、通常細胞融合によって製造されるハイブリドーマ（融合細胞）から取得することができる。すなわち、上記ポリクローナル抗体の場合と同様、上記の感作抗原を免疫感作した哺乳動物から抗体産生細胞を単離し、これと骨髄腫細胞とを融合させてハイブリドーマを形成させ、当該ハイブリドーマをクローン化し、上記の感作抗原をマーカー抗原として、それに対して特異的な親和性を示す抗体を生産するクローンを選択することによって製造される。また、あらかじめ単離された脾細胞あるいはリンパ球等に培養液中で上記の感作抗原を作用させて生じる抗体産生細胞も使用することができる。この場合にはヒト由来の抗体産生細胞も調製可能である。

20

【0015】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製はケーラーおよびミルシュタインの方法（Nature, Vol. 256, pp. 495-497, 1975）およびその変法に従って行うことができる。すなわち、本発明のモノクローナル抗体は、前述のごとく免疫感作された動物から取得される脾細胞、リンパ節細胞、末梢リンパ球、骨髄腫細胞あるいは扁桃細胞等、好ましくは脾細胞に含まれる抗体産生細胞と、好ましくは同種のマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒトの骨髄腫細胞（ミエローマ）との融合により得られるハイブリドーマを培養することにより調製される。培養は、インビトロまたはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ等の哺乳動物、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹腔内等でのインビボで行うことができ、抗体はそれぞれ培養上清あるいは哺乳動物の腹水から取得することができる。

30

【0016】

細胞融合に用いられる骨髄腫細胞としては、例えばマウス由来ミエローマP3/X63-AG8, P3/NS1/1-Ag4-1, P3/X63-Ag8.U1, SP2/0-Ag14, F0あるいはBW5147, ラット由来ミエローマ210RCY3-Ag1.2.3., ヒト由来ミエローマU-266AR1, GML500-6TG-A1-2, UC729-6, CEM-AGR, D1R11あるいはCEM-T15等が挙げられる。

【0017】

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖のみられたウェル中の培養上清の、マーカー抗原に対する反応性を、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ等によって測定することにより行うことができる。

40

【0018】

モノクローナル抗体の単離精製は、上述のような方法によって製造される該抗体含有培養上清あるいは腹水を、イオン交換クロマトグラフィー、抗イムノグロブリンカラムまたはプロテインAカラム等のアフィニティーカラムクロマトグラフィーに付すことにより行うことができる。

【0019】

モノクローナル抗体は、上述の製造方法に限定されることなく、いかなる方法で得られ

50

たものであってもよい。また、通常モノクローナル抗体は免疫感作を施す哺乳動物の種類によりそれぞれ異なる構造の糖鎖を有するが、本発明におけるモノクローナル抗体は、該糖鎖の構造差異により限定されるものではなく、あらゆる哺乳動物由来のモノクローナル抗体をも包含するものである。さらに、例えばヒト免疫グロブリン遺伝子を組み込まれたトランスジェニック動物から得られる組換えヒト型モノクローナル抗体、あるいはある哺乳動物由来のモノクローナル抗体の定常領域(Fc)をヒト由来モノクローナル抗体のFc領域と組換えたキメラモノクローナル抗体、さらには抗原と相補的に直接結合し得る相補性決定部位(CDR)以外の全領域をヒト由来モノクローナル抗体の対応領域と組換えたキメラモノクローナル抗体も上記のモノクローナル抗体に包含される。

【0020】

また、本発明の除去方法Iにおいて、微生物等が結合する抗体には、前記のポリクローナル抗体、モノクローナル抗体(mAb)等の天然型抗体、遺伝子組換え技術を用いて製造され得るキメラ抗体、ヒト化抗体や一本鎖抗体に加えて、これらの抗体の断片が含まれる。抗体の断片とは、特異的結合活性を有する前述の抗体の一部分の領域を意味し、具体的にはFab、Fab'、F(ab')₂、scAb、scFv、またはscFv-Fc等を包含する。

【0021】

また、当業者であれば、上記の抗体または断片と他のペプチドやタンパク質との融合抗体を作製することや、修飾剤を結合させた修飾抗体を作製することも可能である。融合に用いられる他のペプチドやタンパク質は、抗体の結合活性を低下させないものである限り特に限定されず、例えば、ヒト血清アルブミン、各種tagペプチド、人工ヘリックスモチーフペプチド、マルトース結合タンパク質、グルタチオンSトランスフェラーゼ、各種毒素、その他多量体化を促進しうるペプチドまたはタンパク質等が挙げられる。修飾に用いられる修飾剤は、抗体の結合活性を低下させないものである限り特に限定されず、例えば、ポリエチレングリコール、糖鎖、リン脂質、リボソーム、低分子化合物等が挙げられる。

【0022】

本発明の除去方法Iで用いられる抗体は担体に固相化されていることを特徴とする。担体は、免疫学的検出方法で使用されうる担体であれば特に制限はないが、例えば、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、ガラス、金属薄膜、ニトロセルロース膜等が挙げられる。担体への抗体の固相化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固相化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。

【0023】

本発明の除去方法Iにおいて、本発明の第一ゲルは、分散質が架橋ないしは会合することによって流動性を喪失し、かつゲルの流通経路および反応槽に目詰まりしない大きさと形状のものであれば、抗原としての微生物等を抗体から除去することができる。しかし、一定の範囲の硬度を有するゲルであれば、より効率的に微生物等を抗体から除去することができる。本発明においてゲルの硬度は、破断強度によって定義される。ここで、破断強度は、直径100 mm×厚さ10 mmの円盤状に調製したゲルに対して、テキソグラフを用いて、断面積2.0 cm²のプランジャーを毎秒0.8 mmで下降させて、圧縮することにより破断するのに要する力(g/cm²)と定義する。本発明の除去方法Iで使用されるゲルの破断強度は、通常どのような値であってもよく、好ましくは、4-1,100g/cm²、より好ましくは、8-1,100g/cm²である。ゲルの破断強度が、4-1,100g/cm²の範囲にある場合、微生物等を抗体から効率的に除去することができ、8-1,100g/cm²の範囲である場合、さらに微生物等を抗体から効率的に除去することができる。

また、本発明の除去方法Iにおいて、本発明の第一ゲルの流動速度、流動時間、流動させる際の温度は、当業者が適宜決定することができる。

例えば、本発明の第一ゲルの流動速度は、通常、100 μm/s-100 mm/s、好ましくは、50 0 μm/s-25 mm/sである。

また、例えば、本発明の第一ゲルの流動時間は、通常、30秒-1200秒、好ましくは、60

10

20

30

40

50

秒-480秒である。

また、例えば、本発明の第一ゲルの流動させる際の温度は、通常、4 -37、好ましくは、15 -30 である。

【0024】

本発明の第一ゲルは、多糖類、タンパク質または合成高分子のゲルであってよい。本発明の第一ゲルに用いる多糖類としては、アガロース、寒天、カラギーナン、ペクチン、アルギン酸ナトリウム、グルコマンナン、ジェランガム、キサンタンガム、ローカストビーンガム、タマリンドシードガム、カードランなどが挙げられ、好ましくは、アガロース、寒天、カラギーナンである。本発明の第一ゲルに用いるタンパク質としては、ゼラチン、大豆カゼイン、フィブリン、卵白タンパク質、ホエイタンパク質などが挙げられ、好ましくは、ゼラチンである。本発明の第一ゲルに用いる合成高分子としては、ポリアクリルアミド、ポリアクリル酸ナトリウム、ポリ塩化ビニル、ポリビニルアルコールなどが挙げられる。

ゲルは公知の方法で作製することができる。例えば、アガロースゲルは、蒸留水にアガロース粉末を加えて沸騰させアガロース溶液を作製した後、加熱した蒸留水でアガロース溶液を所望の濃度に希釈したのち、4 にすることで調製できる。また、ゼラチンゲルは、加熱した蒸留水にゼラチン粉末を加えてゼラチン溶液を作製した後、加熱した蒸留水で所望の濃度に希釈したのち、4 にすることで調製できる。また、寒天ゲルは、蒸留水に寒天末を加えて沸騰させ寒天溶液を作製した後、加熱した蒸留水で寒天溶液を所望の濃度に希釈したのち、4 にすることで調製できる。カラギーナンゲルは、蒸留水にカラギーナンゲル粉末を加えて沸騰させカラギーナンゲル溶液を作製した後、塩化カリウム水溶液でカラギーナンゲル溶液を所望の濃度に希釈したのち、4 にすることで調製できる。

【0025】

本発明の除去方法Iにおいて、担体表面上で本発明の第一ゲルを流動させる前、流動させた後、または流動の前後両方において、洗浄バッファーで該担体表面を洗浄してもよい。洗浄バッファーは、後述する本発明の除去方法IIにおける被験試料を溶かす溶媒であって、抗原抗体反応に適した生理的な塩類溶液であれば特に制限はなく、例えば、0.2% BSAと0.02% Tween20を含むPBS、0.2% BSA、0.02% Tween20及び5 mmol/L EDTAを含むPBS、0.1% Caseinを含むD-PBS(-)などが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の洗浄バッファーの洗浄速度、洗浄時間、洗浄する際の温度は、当業者が適宜決定することができる。

【0026】

上記の通り、抗原としての微生物等が結合している抗体が固相化されている担体表面上でゲルを流動させることによって該抗体から該微生物等を除去することができる。しかし、微生物等と抗体の間の結合は、該微生物等と該抗体の組み合わせに依存するため、本発明の除去方法Iを用いても、該抗体から該微生物等を部分的に除去するに止まる場合がある。本発明者らは、ゲルに加えて塩水溶液による塩析効果を利用することによって、本発明の除去方法Iでも除去しきることができない微生物等であっても除去することに成功した。

従って、本発明はまた、抗原としての微生物等が結合している抗体が固相化されている担体表面上で本発明の第一ゲルと塩水溶液を含む混合物を流動させ、洗浄後、本発明の第一ゲルと同一または異なるゲル（以下、本発明の第二ゲルと記載する場合もある）を再度流動させることを含む、該抗体から該微生物等を除去する方法（以下、本発明の除去方法IIと記載する場合もある）を提供する。

【0027】

本発明の除去方法IIで抗体に結合している微生物、細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞またはウイルスとしては、本発明の除去方法Iに記載した微生物等と同様であってよい。微生物の場合、エシェリキア属(*Escherichia*)、シュードモナス属(*Pseudomonas*)またはストレプトコッカス属(*Streptococcus*)に属する細菌が好ましい。また、その中でもエシェリキア属(*Escherichia*)に属する細菌として大腸菌(*Escherichia coli*)が挙

げられ、好ましくは026株、091株、0103株、0111株、0115株、0121株、0128株、0145株、0157株および0159株が挙げられる。シュードモナス属(*Pseudomonas*)に属する細菌としては、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)が挙げられ、好ましくはNCTC12924株が挙げられる。ストレプトコッカス属(*Streptococcus*)に属する具体的な細菌としては、肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)がより好ましく、血清型15B/Cまたは35Bがさらに好ましい。また、細胞の場合、動物細胞が好ましく、その中でも肥満細胞が好ましい。小胞の場合、エクソソームが好ましい。

【0028】

本発明の除去方法IIにおいて、上記の微生物等が結合する抗体および該抗体が固相化される担体としては、本発明の除去方法Iに記載した抗体、担体と同様であってよい。

10

【0029】

本発明の除去方法IIで使用される本発明の第一ゲルおよび本発明の第二ゲルは、本発明の除去方法Iに記載したゲルと同様であってよい。本発明の第一ゲルと本発明の第二ゲルは同一のゲルであっても異なるゲルであってもよいが、本発明の第一ゲルがアガロースゲルである場合、本発明の第二ゲルはゼラチンゲルであることが好ましい。なお、本発明の除去方法IIにおいて、ゲルの硬度、担体表面上を流動させるゲルの流動速度、流動時間、流動させる際の温度は、本発明の除去方法Iの条件と同様であってよい。

【0030】

本発明の除去方法IIで使用される本発明の第一ゲルと混合される塩水溶液としては、塩析効果により微生物等を溶出できる塩水溶液であれば特に制限はない。塩としては、例えば、いわゆるホフマイスター系列の上位に並ぶ、 CO_3^{2-} 、 SO_4^{2-} 、 H_2PO_4^- と NH_4^+ 、 K^+ 、 Na^+ の組み合わせによる塩などが挙げられるが、好ましくは硫酸アンモニウムが挙げられる。また、塩水溶液は、塩析効果を生じさせることができれば、その濃度は限定されないが、好ましくは、飽和塩水溶液である。本発明の第一ゲルと塩溶液は任意の量比で混合してよいが、扱いやすいという点から等量で混合することが好ましい。

20

【0031】

本発明の除去方法IIにおいて、担体表面上で本発明の第一ゲルと塩水溶液を含む混合物を流動させる前において、該塩水溶液で担体表面を洗浄してもよい。本発明の塩水溶液の洗浄速度、洗浄時間、洗浄する際の温度は、当業者が適宜決定することができる。

また、本発明の除去方法IIにおいて、担体表面上で本発明の第二ゲルを流動させる前、流動させた後、または流動の前後両方において、洗浄バッファーで担体表面を洗浄してもよい。洗浄バッファーの組成、洗浄バッファーの洗浄速度、洗浄時間、洗浄する際の温度は、本発明の除去方法Iの条件と同様であってよい。

30

【0032】

微生物等は抗体に対してある程度大きいため、複数個所で結合していると考えられる。その場合、pHを変化させるなどの化学的手段だけでは抗体から微生物等を除去できない。しかし、本発明の除去方法I(または本発明の除去方法II)のように、ゲルを抗体が固相化された担体表面上で流動させることによって微生物等を抗体から物理的に引きはがすような作用が生じていると考えられる。また、本発明の除去方法I(または本発明の除去方法II)は、微生物等と結合した抗体のみならず、タンパク質と結合した抗体にも適用

40

【0033】

上記の通り、本発明の除去方法I(または本発明の除去方法II)で微生物等を除去された抗体が固相化された担体は、使い捨てることなく繰り返し微生物等の免疫学的検出に使用することができる。従って、本発明はまた、抗原としての微生物等が結合している抗体が固相化されている担体表面上で本発明の第一ゲルを流動させることによって該抗体から該微生物等を除去し、新たに被験試料を該担体に接触させ、免疫学的手法で該微生物等を検出することを含む、該微生物等の免疫学的検出方法を提供する。さらに本発明はまた、抗原としての微生物等が結合している抗体が固相化されている担体表面上で本発明の第一ゲルと塩水溶液を含む混合物を流動させ、洗浄後、本発明の第一ゲルと同一または異なる

50

る本発明の第二ゲルを再度流動させることによって該抗体から該微生物等を除去し、新たに被験試料を該担体に接触させ、免疫学的手法で該微生物等を検出することを含む、該微生物等の免疫学的検出方法を提供（以下、本発明の免疫学的検出方法と記載する場合がある）する。

【0034】

本発明の免疫学的検出方法で使用される被験試料は、本発明の除去方法Ⅰ（または本発明の除去方法Ⅱ）において、担体に固相化されている抗体が捕捉する対象の微生物等を含む試料であれば特に制限なく、例えば、食料品、血液試料、唾液、尿、糞、体液、細胞培養液、培養細胞、培養微生物、環境水、土壌などが挙げられる。

【0035】

本発明の免疫学的検出方法で用いる免疫学的手法は、特に制限されるべきものではなく、被験試料中の微生物等と対応する抗体からなる微生物-抗体複合体を化学的または物理的手段により検出する免疫学的検出法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。また、必要に応じて既知量の微生物等を含む標準液を用いて作製した標準曲線より微生物等の量の算出を行うこともできる。本発明の免疫学的検出方法で用いる免疫学的手法としては、ELISA、免疫センサーなど、パッチ系、フロー系を問わずに固相表面で抗原抗体反応させる手法であれば良い。

【0036】

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

【0037】

サンドイッチ法においては、担体に固相化された抗体に微生物等を含む可能性のある試料を反応させ（1次反応）、さらに該微生物等に対する標識二次抗体を反応させ（2次反応）た後、担体上の標識剤の量（活性）を測定することにより、試料中の微生物等を検出および定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行ってもよいし時間をずらして行ってもよい。

【0038】

あるいは、表面プラズモン共鳴（SPR）法による免疫センサーを用いて、市販のセンサーチップの表面上に、常法に従って抗体を固定化し、これに微生物等を含む可能性のある試料を接触させた後、該センサーチップに特定の波長の光を特定の角度から照射し、共鳴角度の変化を指標にして、固定化した抗体への微生物等の結合の有無を判定することができる。

【0039】

上記の通り、抗原としての微生物等が結合した抗体が固相化されている担体表面上でゲルを流動させ、該抗体から該微生物等を除去し、被験試料に含まれる別の微生物等を該抗体に再結合させ、上記の免疫学的手法を用いて該微生物等を検出することによって、繰り返し、抗体が固相化された担体を再利用することができる。

【0040】

本発明はまた、抗原としての微生物、細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞またはウイルスが結合している抗体が固相化されている担体表面上でゲルを流動させる機構を含む、該抗体から該微生物等を除去する装置を提供（以下、本発明の装置と記載する場合がある）する。

【0041】

10

20

30

40

50

本発明の装置で抗体に結合している微生物等、該微生物等が結合する抗体、該抗体が固相化される担体としては、本発明の除去方法Ⅰ（または本発明の除去方法ⅠⅠ）、本発明の免疫学的検出方法において記載した微生物等、抗体、担体と同様であってよい。

【0042】

本発明の装置で使用されるゲルは、本発明の除去方法Ⅰ（または本発明の除去方法ⅠⅠ）、本発明の免疫学的検出方法に記載したゲルと同様であってよい。なお、ゲルの硬度、担体表面上を流動させるゲルの流動速度、流動時間、流動させる際の温度は、本発明の除去方法Ⅰ（または本発明の除去方法ⅠⅠ）、本発明の免疫学的検出方法に記載した条件と同様であってよい。また、本発明の装置では、本発明の除去方法ⅠとⅠⅠのように本発明の第一ゲルと第二ゲルを順番に供給することもできる。

10

【0043】

本発明の装置において、担体表面上でゲルを流動させる機構（以下、本発明の機構と記載する場合がある）は、担体表面上でゲルを流動させることができるものであれば特に制限されない。例えば、図12に示す通り、本発明の機構は、ゲル/サンプル/バッファー用インレット、フローセルが据え付けられた金属膜とプリズムからなる担体、アウトレットを含む。本発明の機構において、被験試料、洗浄バッファー、ゲルがインレットから供給され、フローセルが据え付けられた担体まで押し出され、アウトレットから排出される。より具体的には、インレットから供給された被験試料が、担体表面上に接触し、該被験試料に含まれる微生物等が該担体に固相化された抗体に捕捉される。次いで、洗浄バッファーがインレットから供給され、被験試料と共にアウトレットから排出される。その後、ゲルがインレットから供給され、担体表面上を流動することによって該担体に固相化された抗体に捕捉された微生物等を除去する、最後に、洗浄バッファーがインレットから供給され、ゲルと共にアウトレットから排出される。その際、担体表面上でゲルが所望の流動速度、流動時間、温度で供給されるように供給圧が調節されてもよい。従って、ゲルの供給圧を調節するために、本発明の機構は、図12に示す通り、三方弁とゲル用ループをさらに備えてもよい。三方弁の3つの弁のうち、ゲル用ループ側の流路につながる弁のみを開放することによってゲル用ループ中にゲルを滞留させて、担体表面上でゲルが所望の流動速度、流動時間、温度が供給されるように供給圧を調節することができる。

20

【0044】

本発明の装置は、担体に固相化された抗体に微生物等が捕捉されているか否かを継時的に観測するための機構を含んでいてもよい。そのような機構としては、例えば、SPR法のための光源、反射光検出器および反射光解析装置が挙げられる。本機構により、担体に固相化された抗体に微生物等が結合しているか否かをリアルタイムに検出することができる。

30

【実施例】

【0045】

以下において、実施例により本発明をより具体的に説明するが、この発明はこれらに限定されるものではない。

【0046】

表面プラズモン共鳴(SPR)によるイムノセンサーの構築

40

SPRによるイムノセンサーは、マイクロアレイ型SPRi装置（(株)堀場製作所：OpenPlex）、装置専用のパイオチップ（(株)堀場製作所：CS-HD）、及び、大腸菌のO抗原に対するウサギ抗血清10種類（デンカ生研(株)：病原大腸菌免疫血清「生研」O111、O157、O26、O91、O103、O115、O121、O128、O145、O159）、肺炎球菌の莢膜抗原に対するウサギプール抗血清2種類（Statens Serum Institut社：Pneumococcus Pool Antisera Type G、Type S）、エクソソームのCD9に対するCD9モノクローナル抗体（R&D system, Inc., MAB1880）、マウスのmast cellのCD117に対するHuman/Mouse CD117/c-Kit抗体（R&D systems Inc., AF1356）、緑膿菌に対する緑膿菌群別用免疫血清「生研」I群（デンカ生研, 213662）を用いて構築した。抗血清については、各抗血清からプロテインG（GE Healthcare社：Protein G Sepharose 4 Fast Flow）を用いて、取り扱い説明書に従い予め抗体を精製した。調

50

製した抗体を、CS-HDの取扱説明書に従い、バイオチップに固相化し、センサーチップを作製した。このチップをSPR装置に装着し、微生物等の検出に用いるイムノセンサーとした。

【0047】

ゲルの作製

1.ゼラチンゲル

85 に加熱した蒸留水500 mLに、ゼラチン(ナカライテスク(株):精製粉末)50 gを加えて溶解し、10%ゼラチン溶液を調製した。これを85 に加熱した蒸留水を用いて、10, 8, 6, 4, 3, 2, 1.5, 1.3, 1.1, 1.0, 0.7, 0.5%に希釈した後に4 で4日間静置し、各濃度のゼラチンゲルを調製した。

10

2.アガロースゲル

蒸留水500 mLにアガロース(ナカライテスク(株):低電気浸透、高ゲル強度)15 gを加えて沸騰させ、3%アガロース溶液を調製した。これを85 に加熱した蒸留水を用いて、3, 2, 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125%に希釈した後に4 で1時間静置し、各濃度のアガロースゲルを調製した。

3.寒天ゲル

蒸留水500 mLに精製寒天末(ナカライテスク(株):微生物培養用)1 gを加え、沸騰させて溶解した後に4 で1時間静置し、0.2%寒天ゲルを調製した。

4.カラギーナンゲル

蒸留水500 mLにカラギーナン(ナカライテスク(株))1 gを加え、沸騰させて溶解した後に、3.5 mol/L塩化カリウム12.5 mLを添加して4 で1時間静置し、0.2%カラギーナンゲルを調製した。

20

【0048】

実施例1 大腸菌(*Escherichia coli*)のO抗原の検出とセンサーチップの再生(1)

大腸菌は、O111、O157の血清型を示す2株を用いた。構築したイムノセンサーは、センサーチップ表面への分子の結合によって誘起されるSPR現象に伴う反射光の変化量を反射率(%)として、3秒毎に測定することができる。センサーチップ表面へのバッファー、サンプルまたは再生液の接触は、Flow-cell(図1)を介して行った。Flow-cellは、Gasket全体がセンサーチップに完全に覆われるような位置(図2)で、センサーチップと接触固定する。また、Flow-cellの平面のうち、Gasketの枠に囲まれた平面は、Gasketの枠の周囲の平面よりも、80 μm凹んでいる。結果的に、Flow-cellと接触したセンサーチップは、Flow-cellのGasketの枠に囲まれた平面とセンサーチップ表面の間に幅80 μmの空間的隙間が生じる。従って、Flow-cellにFittingを介して連結された片方のポリ塩化ビニルチューブ(内径380 μm)から送液されたバッファー等は、幅80 μmの空間的隙間を満たすことによってセンサーチップ表面に接触し、もう片方のポリ塩化ビニルチューブから排泄される。測定前に、抗体を固相化したセンサーチップ表面にバッファーA(0.2%BSAと0.02%Tween20を含むPBS)を50 μL/分の流速で送液しコンディショニングした。この時点の反射率を0%として測定を開始した。まず、菌体2株をバッファーAに懸濁しセンサーチップ表面に240秒間送液した後、バッファーAを260秒間送液した。この時点の反射率は、O111が4.3%、O157が1.6%となり、菌体がチップ上の固相化抗体と結合した(図3-(1)及び(2))。

30

40

次に、センサーチップの再生、すなわち固相化抗体と結合した菌体の除去を試みた。再生には、菌体を完全にまたは部分的に除去できること、そして固相化抗体には影響がないことが求められる。従来法である100 mmol/L グリシンバッファー(pH 2.0)、新しい試みである3%ゼラチンゲル、0.2%アガロースゲル、0.2%寒天ゲル、0.2%カラギーナンゲルを再生液としてそれぞれ60秒間送液した(図3-(3))。なお、3%ゼラチンゲルは、室温での溶解を防ぎゲル強度を保つために、氷冷したものを使用した。次に、バッファーAを240秒間送液し、チップ表面に残った再生液を除去した。結果は、図3-(4)から明らかのように、100 mmol/L グリシンバッファー(pH 2.0)送液後ではO111の反射率が4.1%、O157が1.0%と、測定開始時の0%に戻らず、菌体をほとんど除去できなかった。一方、3%ゼ

50

ラチンゲル、0.2%アガロースゲル、0.2%寒天ゲルまたは0.2%カラギーナンゲル送液後は、いずれも反射率が0%に収束し、O111、O157を完全に除去できた。また、再生後のチップを用いて再度実験を行った結果、元の反射率が再現された。これらの結果から、3%ゼラチンゲル、0.2%アガロースゲル、0.2%寒天ゲル、0.2%カラギーナンゲルは、センサーチップを好適に再生できることが明らかになった。

【0049】

実施例2 肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)の莢膜抗原の検出とセンサーチップの再生

肺炎球菌は、15B/C、35Bの血清型を示す2株を用いた。15B/CはType S、35BはType Gの抗血清で凝集反応を示す。

測定前に、抗体を固相化したセンサーチップ表面にバッファーB(0.2% BSA、0.02% Tween20、及び、5 mmol/L EDTAを含むPBS)を50 μ L/分の流速で送液し、コンディショニングした。この時点の反射率を0%として、測定を開始した。まず、菌体2株をバッファーBに懸濁してセンサーチップ表面に送液した。肺炎球菌と抗体との結合速度は遅く、液の流れにより結合が阻害される。そこで送液を停止し、菌体懸濁液をチップ表面に900秒間留めることによって、菌体と抗体を結合させた。この時点の反射率は、Type Gが0.36%、Type Sが0.32%となり、菌体がチップに固相化した抗体と結合した(図4-(1))。

次にセンサーチップの再生を試みた。まず、上記の大腸菌O抗原検出後に行った操作と同様に3%ゼラチンゲルを用いた再生方法を試みた結果、Type Sの反射率は0%に収束したものの、Type Gの反射率は0.14 - 0.31%に止まり、センサーチップの再生は部分的であった。このことから、肺炎球菌は菌株によっては大腸菌と比べて抗体との結合が強いことがわかった。そこで、ゲルの再生効果だけではなく硫酸アンモニウムによる塩析効果を組み合わせた菌体の除去を試みた。

つまり、検出後にまず、流速 9000 μ L/分で50%飽和硫酸アンモニウムを120秒間送液後、流速50 μ L/分で0.2%アガロースゲルと50%飽和硫酸アンモニウムの等量混合液を60秒間送液した(図4-(2)及び-(3))。その結果、反射率はType Gで0.07 - 0.08%、Type Sで0%となり、Type Sでは菌体が除去できたが、Type Gの一部の菌とアガロースゲルがチップ表面に積り、完全には再生できなかった。しかしこれらは、流速 9000 μ L/分でバッファーBを60秒間、氷冷した1.5%ゼラチンゲルを60秒間送液することによって除去できた(図4-(4)及び-(5))。最後に、流速50 μ L/分でバッファーBを1000秒間送液した(図4-(6))が、菌体が完全に除去できたことは、Type G、Type S共に反射率が0%に収束したことから明らかであった。また、再生後のチップを用いて再度実験を行った結果、元の反射率が再現されたことから、固相化抗体に影響がないことが明らかになった。また、塩析による再生効果を確かめるために、50%飽和硫酸アンモニウムのみで行った結果、反射率は検出時と変わらず、再生できなかった。肺炎球菌の場合においても、チップの再生はゲルを用いて可能であり、特にアガロースとゼラチンゲルの組み合わせが効果的だった。

【0050】

実施例3 ゲル強度と再生効果の関係

上述と同様の調製方法で直径100 mm×厚さ10 mmの円盤状に調製したゼラチンゲル、及びアガロースゲルを用いてゲル強度を測定した。測定にはテキソグラフ((株)日本食品開発研究所:製造番号9904-053)を使用し、圧縮によりゲルを破断するのに要する力(g/cm^2)を測定した。なお、圧縮は、断面積2.0 cm^2 のプランジャーを毎秒0.8 mmで下降させて行った。一方、ゲルの再生効果は、大腸菌O111とO157の検出と再生を行ったときに、下記の式で算出される値とし、再生効果が80 - 120%の範囲にあるとき、再生できたと定義した。

$(0\text{抗原検出時の反射率} - \text{ゲルによるチップ再生後の反射率}) / 0\text{抗原検出時の反射率} \times 100 = \text{再生効果}(\%)$

測定したゲル強度と再生効果を、表1に示した。1.0 - 6%ゼラチンゲル、0.1 - 1%アガロースゲルはO111、O157共に再生効果が88 - 116%だった。ゲル強度は、ゼラチンゲルで8 - 1064 g/cm^2 、アガロースゲルでは4 - 1037 g/cm^2 であり、これらの強度ならチップの再

生に利用できることがわかった。

また、0.5-0.7%ゼラチンゲル、0.0125 - 0.05%アガロースゲルはテキソグラフの測定下限値以下でゲル強度が測定できなかったが、濃度の一番低い0.5%ゼラチンゲル、0.0125%アガロースゲルでも、O157においては高い再生効果があり、チップの再生に利用できることがわかった。

2 - 3%アガロースゲル、8 - 10%ゼラチンゲルはゲル強度が高く流路で目詰まりを起こすため送液することができず、構築したイムノセンサーには使用できなかったものの、再生効果を持つことが予想される。

【 0 0 5 1 】

【表 1】

| ゲル | 濃度 (%) | 破断強度 (g/cm ²) | 再生効果 (%) | |
|------------------|--------|---------------------------|----------|------|
| | | | O111 | O157 |
| ゼラチンゲル (氷冷) | 0.5 | ND | 15 | 91 |
| | 0.7 | ND | 50 | 112 |
| | 1.0 | 8 | 91 | 97 |
| | 1.1 | 22 | 110 | 105 |
| | 1.3 | 44 | NT | NT |
| | 1.5 | 73 | NT | NT |
| | 2 | 165 | 100 | 99 |
| | 3 | 319 | 100 | 99 |
| | 4 | 497 | 105 | 100 |
| | 6 | 1064 | 116 | 112 |
| | 8 | 1423 | ND | ND |
| 10 | 2059 | ND | ND | |
| アガロースゲル (25℃) | 0.0125 | ND | 11 | 72 |
| | 0.025 | ND | 31 | 89 |
| | 0.05 | ND | 92 | 100 |
| | 0.1 | 4 | 112 | 100 |
| | 0.2 | 21 | 100 | 103 |
| | 0.4 | 147 | NT | NT |
| | 0.6 | 382 | NT | NT |
| | 0.8 | 670 | NT | NT |
| | 1 | 1037 | 92 | 88 |
| | 2 | 2448 | ND | ND |
| | 3 | 2403 | ND | ND |

NT : Not test、ND : Not detection (測定機器へのゲルの目詰まりのため)

【 0 0 5 2 】

実施例 4 大腸菌 (*Escherichia coli*) の O 抗原の検出とセンサーチップの再生 (2)

大腸菌は、O26、O91、O103、O115、O121、O128、O145、O159の血清型を示す8株を用いた。実施例 1 と同様に、測定前に、抗体を固相化したセンサーチップ表面にバッファー A (0.2% BSA と 0.02% Tween20 を含む PBS) を 50 μL/分の流速で送液しコンディショニングした。この時点の反射率を 0% として測定を開始した。まず、菌体 8 株を順次バッファー A に懸濁しセンサーチップ表面に各々 240 秒間送液した後、バッファー A を 260 秒間送液した。この時点の反射率は、O26 が 0.9%、O91 が 0.3%、O103 が 0.6%、O115 が 0.5%、O121 が 0.8%、O128 が 0.5%、O145 が 0.7%、O159 が 0.8% となり、菌体がチップ上の固相化抗体と結合した (図 5 ~ 8) 。

次に、センサーチップの再生、すなわち固相化抗体と結合した菌体の除去を試みた。再生には、菌体を完全にまたは部分的に除去できること、そして固相化抗体には影響がないことが求められる。従来法である 100 mmol/L グリシンバッファー (pH 2.0)、10mM NaOH、新しい試みである 3% ゼラチンゲル、0.2% アガロースゲルを再生液としてそれぞれ 60 秒間送液した。なお、3% ゼラチンゲルは、室温での溶解を防ぎゲル強度を保つために、氷冷したものをを使用した。次に、バッファー A を 240 秒間送液し、チップ表面に残った再生液

を除去した。結果は、図5～8から明らかなように、100 mmol/L グリシンバッファー (pH 2.0) 送液後では、O115以外の全ての株で反射率が測定開始時の0%に戻らず、菌体をほとんど除去できなかった。また、10mM NaOH送液後でも、O115以外の全ての株で反射率が測定開始時の0%に戻らなかった。それどころか、10mM NaOH を用いた場合、O26、O91、O121では固相化抗体が部分的に変性したことによって反射率が0%未満に減少した。一方、3%ゼラチンゲルまたは0.2%アガロースゲルを送液後では、いずれも8株において反射率が0%に収束し、菌体を完全に除去できた。これらの結果から、3%ゼラチンゲル、0.2%アガロースゲルは、センサーチップを好適に再生できることが明らかになった。

【0053】

実施例5 HCT116 (ヒト大腸ガン由来細胞)由来エクソソームの検出とセンサーチップの再生

10

HCT116由来エクソソームは、超遠心法によって準備した。実施例1と同様に、測定前に、CD9モノクローナル抗体を固相化したセンサーチップ表面にバッファーC (0.1%Caseinを含むD-PBS(-)) を25 μ L/分の流速で送液しコンディショニングした。この時点の反射率を0%として測定を開始した。HCT116由来エクソソームをバッファーAにより10倍希釈し、センサーチップ表面に480秒間送液した後、バッファーAを480秒間送液した。この時点の反射率は、0.25%となり、エクソソームがチップ上の固相化抗体と結合した(図9)。

次に、センサーチップの再生、すなわち固相化抗体と結合したエクソソームの除去を試みた。エクソソーム除去には、2%ゼラチンゲルを用いた。他の実施例と同様に2%ゼラチンゲルは、室温での溶解を防ぎゲル強度を保つために、氷冷したものを使用した。2%ゼラチンゲルは、480秒間/回で2回送液した。その後、バッファーAを360秒間送液し、チップ表面に残った再生液を除去した。結果は、2%ゼラチンゲルを2回送液後、エクソソームにおいても反射率が0%に収束し、エクソソームを完全に除去できた。

20

【0054】

実施例6 肥満細胞 (マウス骨髄由来) の検出とセンサーチップの再生

肥満細胞は10%ウシ胎児血清とインターロイキン-3を含むRPMI1640培地で培養した。実施例1と同様に、測定前に、CD117/c-Kit 抗体を固相化したセンサーチップ表面にバッファーC (0.1%Caseinを含むD-PBS(-)) を25 μ L/分の流速で送液しコンディショニングした。この時点の反射率を0%として測定を開始した。バッファーA に懸濁した肥満細胞をセンサーチップ表面に480秒間送液した後、バッファーAを200秒間送液した。この時点の反射率は、0.27%となり、肥満細胞がチップ上の固相化抗体と特異的に結合した(図10)。

30

次に、センサーチップの再生、すなわち固相化抗体と結合した肥満細胞の除去を試みた。肥満細胞除去には3%ゼラチンゲルを用いた。他の実施例と同様に3%ゼラチンゲルは、室温での溶解を防ぎゲル強度を保つために、氷冷したものを使用した。3%ゼラチンゲルは480秒間送液した。その後、バッファーAを480秒間送液し、チップ表面に残った再生液を除去した。結果は、3%ゼラチンゲルを送液後、肥満細胞においても反射率が0%に収束し、肥満細胞を完全に除去できた。

【0055】

実施例7 *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC12924: 緑膿菌) の検出とセンサーチップの再生

40

緑膿菌は、Soybean-casein digest agar (SC寒天培地, 日本製薬)で培養した。緑膿菌に対する抗体は、緑膿菌群別用免疫血清「生研」I群 (デンカ生研, 213662) から精製したポリクローナル抗体を使用した。精製した抗体をセンサーチップ表面に固相化し、バッファーC (0.1%Caseinを含むD-PBS(-)) を25 μ L/分の流速で送液しコンディショニングした。この時点の反射率を0%として測定を開始した。バッファーA に懸濁した緑膿菌をセンサーチップ表面に240秒間送液した後、バッファーAを120秒間送液した。この時点の反射率は、0.5%となり、緑膿菌がチップ上の固相化抗体と特異的に結合した(図11)。

次に、センサーチップの再生、すなわち固相化抗体と結合した緑膿菌の除去を、3%ゼラチンゲルを用いて試みた。他の実施例と同様に3%ゼラチンゲルは、室温での溶解を防ぎ

50

ゲル強度を保つために、氷冷したものを使用した。3%ゼラチンゲルは、240秒間を送液した。その後、バッファ-Aを240秒間送液し、チップ表面に残った再生液を除去した。結果は、3%ゼラチンゲルを送液後、緑膿菌においても反射率が0%に収束し、緑膿菌を完全に除去できた。

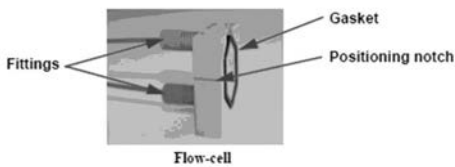
【産業上の利用可能性】

【0056】

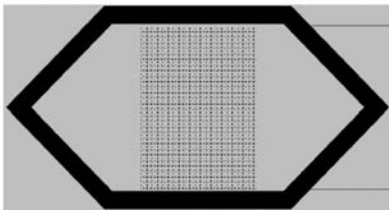
本発明の除去方法を用いることによって、従来は使い捨てていた、微生物等の免疫学的検出方法に用いた、担体に固相化された抗体を再利用することが可能になり、経済的負担が軽くなる。

本出願は、日本で出願された特願2015-244569（出願日：平成27年12月15日）および特願2016-182211（出願日：平成28年9月16日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に含まれるものとする。

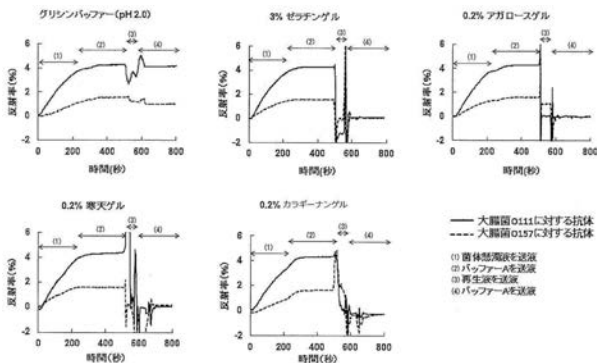
【図1】



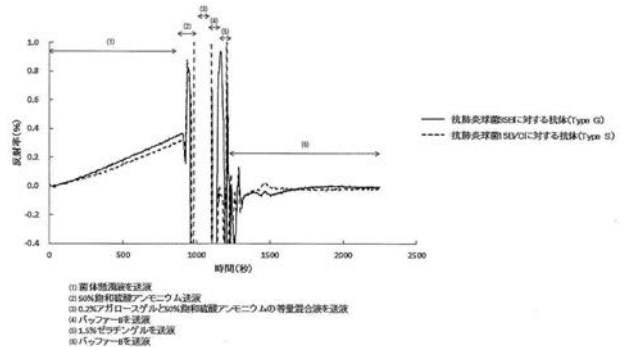
【図2】



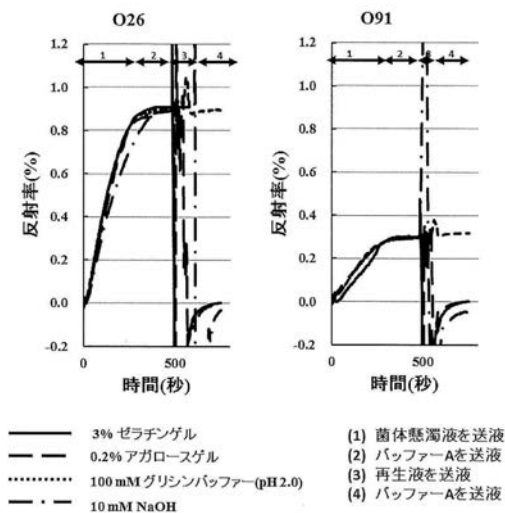
【図3】



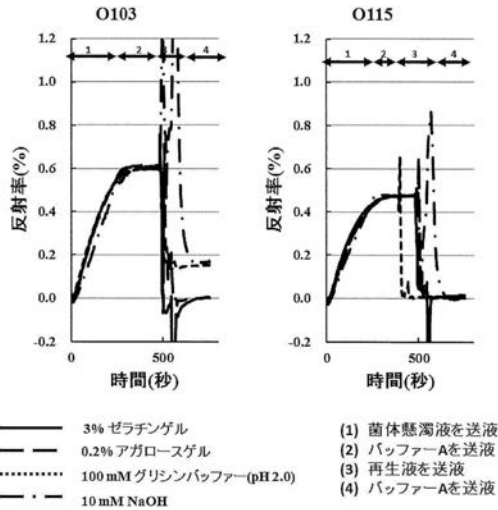
【図4】



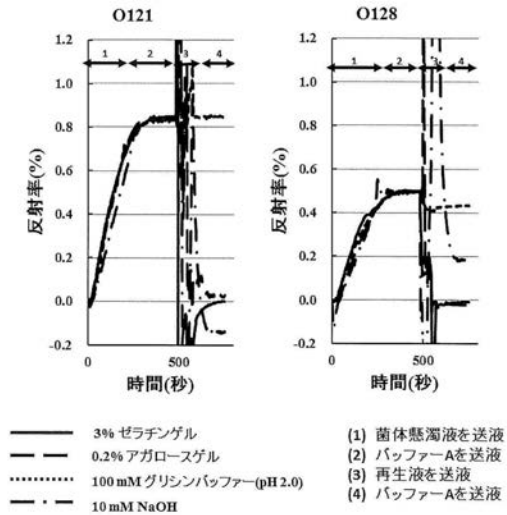
【図5】



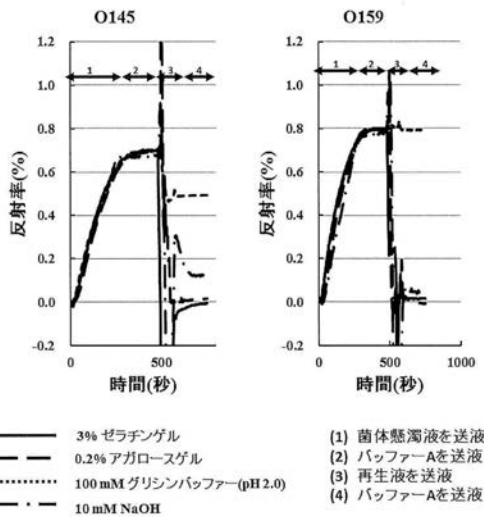
【 図 6 】



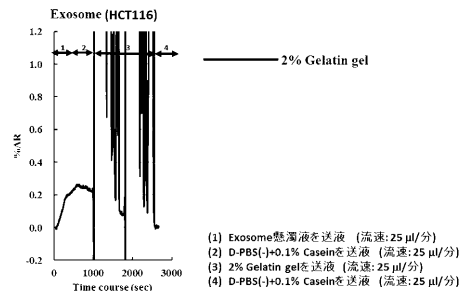
【 図 7 】



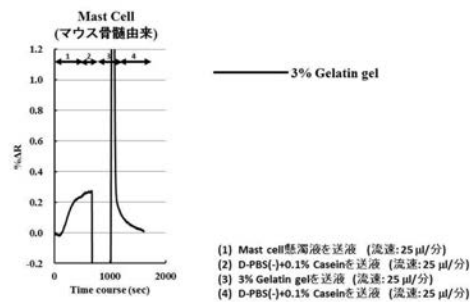
【 図 8 】



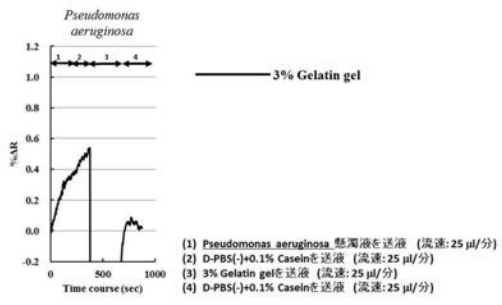
【 図 9 】



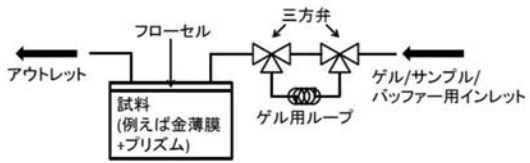
【 図 10 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/JP2016/086946 |
|--|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/543(2006.01)i, C12M1/40(2006.01)i, C12Q1/00(2006.01)i, G01N33/569(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) G01N33/48-G01N33/98, C12M1/40, C12Q1/00 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 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Scopus | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | WO 2014/119529 A1 (Kaneka Corp.), 07 August 2014 (07.08.2014), entire text; all drawings (Family: none) | 1-17 |
| A | JP 2007-533312 A (Henkel KGaA), 22 November 2007 (22.11.2007), entire text; all drawings & WO 2005/103244 A1 entire text; all drawings & US 2007/0212706 A1 entire text; all drawings | 1-17 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 31 January 2017 (31.01.17) | | Date of mailing of the international search report 14 February 2017 (14.02.17) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan | | Authorized officer Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/086946

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | JP 2015-72280 A (Biocept, Inc.), 16 April 2015 (16.04.2015), entire text; all drawings & WO 2010/111388 A2 entire text; all drawings & US 2010/0255479 A1 entire text; all drawings | 1-17 |
| A | JP 2010-286466 A (Fujifilm Corp.), 24 December 2010 (24.12.2010), entire text; all drawings & WO 2010/047419 A1 entire text; all drawings & EP 2350660 A1 entire text; all drawings | 1-17 |
| A | JP 2002-504987 A (BBI Bioseq, Inc.), 12 February 2002 (12.02.2002), entire text; all drawings & WO 1998/000032 A1 entire text; all drawings & US 6635469 B1 entire text; all drawings | 1-17 |
| A | JP 2-295493 A (Takaomi NISHIMICHI), 06 December 1990 (06.12.1990), entire text; all drawings (Family: none) | 1-17 |
| A | BULARD, Emilie et al., Carbohydrates as new probes for the identification of closely related <i>Escherichia coli</i> strains using surface plasmon resonance imaging, <i>Analytical chemistry</i> , 2015.01.12, Vol. 87, p. 1804-1811 | 1-17 |
| A | GUO, Xuefei et al., Carbohydrate-based label- free detection of <i>Escherichia coli</i> ORN 178 using electrochemical impedance spectroscopy, <i>Analytical chemistry</i> , 2012, Vol. 84, p. 241-246 | 1-17 |
| A | NAIK, Amith D et al., Performance of hexamer peptide ligands for affinity purification of immunoglobulin G from commercial cell culture media, <i>Journal of chromatography A</i> , 2011, Vol. 1218, p. 1691-1700 | 1-17 |
| A | KATO, Koichi et al., High-throughput immunophenotyping by surface plasmon resonance imaging, <i>Analytical chemistry</i> , 2007, Vol. 79, p. 8616-8623 | 1-17 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/086946

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | TANG, Yijun et al., Nonregeneration protocol for surface plasmon resonance: study of high-affinity interaction with high-density biosensors, <i>Analytical chemistry</i> , 2006, Vol. 78, p. 1841-1848 | 1-17 |

| 国際調査報告 | | 国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 8 6 9 4 6 | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|--------------------------------------|-------------|--------------|--------------|---------------------------------|---|--|---|--|---|---------------------------|-------------------|------------------------------|--|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, C12M1/40(2006.01)i, C12Q1/00(2006.01)i, G01N33/569(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. G01N33/48-G01N33/98, C12M1/40, C12Q1/00 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017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 | 1971-2017年 | 日本国実用新案登録公報 | 1996-2017年 | 日本国登録実用新案公報 | 1994-2017年 | | | | |
| 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 | | | | | | | | | | | | | | |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2017年 | | | | | | | | | | | | | | |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2017年 | | | | | | | | | | | | | | |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2017年 | | | | | | | | | | | | | | |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Scopus | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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 | | | | | | | | | | | | | |
| A | WO 2014/119529 A1 (株式会社カネカ) 2014.08.07, 全文、全図 (ファミリーなし) | 1-17 | | | | | | | | | | | | | |
| A | JP 2007-533312 A (ヘンケル・コマンディットゲゼルシャフト・アウフ・アクチエン) 2007.11.22, 全文、全図 & WO 2005/103244 A1 (全文、全図) & US 2007/0212706 A1 (全文、全図) | 1-17 | | | | | | | | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「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></td> </tr> </table> | | | | * 引用文献のカテゴリー | の日の後に公表された文献 | 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの | 「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 | 「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 | 「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 | 「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) | 「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 | 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 | 「&」 同一パテントファミリー文献 | 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | |
| * 引用文献のカテゴリー | の日の後に公表された文献 | | | | | | | | | | | | | | |
| 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの | 「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 | | | | | | | | | | | | | | |
| 「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 | 「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 | | | | | | | | | | | | | | |
| 「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) | 「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 | | | | | | | | | | | | | | |
| 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 | 「&」 同一パテントファミリー文献 | | | | | | | | | | | | | | |
| 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 国際調査を完了した日 31.01.2017 | | 国際調査報告の発送日 14.02.2017 | | | | | | | | | | | | | |
| 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 | | 特許庁審査官 (権限のある職員) 赤坂 祐樹 | 2 J 8 3 5 6 | | | | | | | | | | | | |
| | | 電話番号 03-3581-1101 内線 3252 | | | | | | | | | | | | | |

| 国際調査報告 | | 国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 8 6 9 4 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 |
| A | JP 2015-72280 A (バイオセプト インコーポレイティッド) 2015.04.16, 全文、全図 & WO 2010/111388 A2 (全文、全図) & US 2010/0255479 A1 (全文、全図) | 1-17 |
| A | JP 2010-286466 A (富士フイルム株式会社) 2010.12.24, 全文、全 図 & WO 2010/047419 A1 (全文、全図) & EP 2350660 A1 (全文、全 図) | 1-17 |
| A | JP 2002-504987 A (ビービーアイ バイオセク インク.) 2002.02.12, 全文、全図 & WO 1998/000032 A1 (全文、全図) & US 6635469 B1 (全文、全図) | 1-17 |
| A | JP 2-295493 A (西道 隆臣) 1990.12.06, 全文、全図 (ファミリー なし) | 1-17 |
| A | BULARD, Emilie et al., Carbohydrates as new probes for the identification of closely related <i>Escherichia coli</i> strains using surface plasmon resonance imaging, Analytical chemistry, 2015.01.12, Vol. 87, p. 1804-1811 | 1-17 |
| A | GUO, Xuefei et al., Carbohydrate-based label-free detection of <i>Escherichia coli</i> ORN 178 using electrochemical impedance spectroscopy, Analytical chemistry, 2012, Vol. 84, p. 241-246 | 1-17 |
| A | NAIK, Amith D et al., Performance of hexamer peptide ligands for affinity purification of immunoglobulin G from commercial cell culture media, Journal of chromatography A, 2011, Vol. 1218, p. 1691-1700 | 1-17 |
| A | KATO, Koichi et al., High-throughput immunophenotyping by surface plasmon resonance imaging, Analytical chemistry, 2007, Vol. 79, p. 8616-8623 | 1-17 |
| A | TANG, Yijun et al., Nonregeneration protocol for surface plasmon resonance: study of high-affinity interaction with high-density biosensors, Analytical chemistry, 2006, Vol. 78, p. 1841-1848 | 1-17 |

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, DJ, 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, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 三宅 司郎

京都府京都市下京区中堂寺南町 1 3 4 番地 公益財団法人京都高度技術研究所内

(72)発明者 山崎 朋美

京都府京都市下京区中堂寺南町 1 3 4 番地 公益財団法人京都高度技術研究所内

Fターム(参考) 4B029 AA27 BB01 BB02 BB11 BB13 BB17 CC03 FA15

4B063 QA01 QA18 QQ05 QQ06 QQ08 QQ10 QQ20 QR43 QR48 QS33

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)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) | 一种从固定在载体上的抗体中除去细胞分泌的微生物，细胞，微生物或囊泡或病毒的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JPWO2017104626A1 | 公开(公告)日 | 2018-10-11 |
| 申请号 | JP2017556050 | 申请日 | 2016-12-12 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 株式会社堀场制作所 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 株式会社堀场制作所 | | |
| [标]发明人 | 三宅 司郎 | | |
| 发明人 | 三宅 司郎 山▲崎▼ 朋美 | | |
| IPC分类号 | G01N33/543 G01N33/53 G01N33/569 C12M1/40 C12Q1/00 | | |
| CPC分类号 | C12M1/40 G01N33/54393 G01N33/569 G01N33/56916 G01N33/56944 G01N33/56966 G01N33/57446 | | |
| FI分类号 | G01N33/543.525.W G01N33/53.Y G01N33/569 C12M1/40.Z C12Q1/00.C | | |
| F-TERM分类号 | 4B029/AA27 4B029/BB01 4B029/BB02 4B029/BB11 4B029/BB13 4B029/BB17 4B029/CC03 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ05 4B063/QQ06 4B063/QQ08 4B063/QQ10 4B063/QQ20 4B063/QR43 4B063/QR48 4B063/QS33 | | |
| 代理人(译) | 高岛 肇 当麻 博文 | | |
| 优先权 | 2015244569 2015-12-15 JP 2016182211 2016-09-16 JP | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)
 本发明提供了去除微生物，细胞，由微生物或细胞分泌的囊泡或作为抗原的病毒的方法，该方法固定在抗体上去除微生物等。本发明还提供了一种用于免疫学检测微生物等的方法，该方法包括从固定在载体上的抗体中去除微生物等，该载体结合有作为抗原的微生物等。

| | | |
|---|-----------------------------------|-------------------------------------|
| (19) 日本国特許庁 (JP) | 再公表特許(A1) | (11) 国際公開番号 WO2017/104626 |
| 発行日 平成30年10月11日 (2018.10.11) | (43) 国際公開日 平成29年6月22日 (2017.6.22) | |
| (51) Int. Cl. | F 1 | テーマコード (参考) |
| GO 1 N 33/543 (2006.01) | GO 1 N 33/543 | 5 2 5 W 4 B 0 2 9 |
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 | Y 4 B 0 6 3 |
| GO 1 N 33/569 (2006.01) | GO 1 N 33/569 | |
| C 1 2 M 1/40 (2006.01) | C 1 2 M 1/40 | Z |
| C 1 2 Q 1/00 (2006.01) | C 1 2 Q 1/00 | C |
| | 審査請求 未請求 | 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) |
| 出願番号 特願2017-556050 (P2017-556050) | (71) 出願人 000155023 | |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP2016/088946 | 株式会社堀場製作所 | |
| (22) 国際公開日 平成28年12月12日 (2016.12.12) | 京都府京都市南区百津院宮の東町2番地 | |
| (31) 優先権主張番号 特願2015-244569 (P2015-244569) | (74) 代理人 100080781 | |
| (32) 優先日 平成27年12月15日 (2015.12.15) | 弁理士 高島 一 | |
| (33) 優先権主張国 日本国 (JP) | (74) 代理人 100125070 | |
| (31) 優先権主張番号 特願2016-182211 (P2016-182211) | 弁理士 土井 京子 | |
| (32) 優先日 平成28年9月16日 (2016.9.16) | (74) 代理人 100136629 | |
| (33) 優先権主張国 日本国 (JP) | 弁理士 鎌田 光宣 | |
| | (74) 代理人 100121212 | |
| | 弁理士 田村 弥栄子 | |
| | (74) 代理人 100174296 | |
| | 弁理士 当麻 博文 | |
| | (74) 代理人 100137729 | |
| | 弁理士 赤井 厚子 | |
| | 最終頁に続く | |

(54) 【発明の名称】 担体に固相化された抗体から微生物、細胞、該微生物もしくは該細胞が分泌する小胞またはウイルスを除去する方法